

普通高等教育“十一五”国家级规划教材



预防医学国家级教学团队教材

基础毒理学

Basic Toxicology

（第二版）

周志俊◎主编

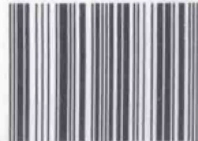
复旦大学出版社


预防医学国家级教学团队教材

基础毒理学

Basic Toxicology

责任编辑 傅淑娟　　封面设计 杨智仁


ISBN 978-7-309-10859-0
9 787309 108590 >
定价：48.00元
www.fudanpress.com


普通高等教育“十一五”国家级规划教材


预防医学国家级教学团队教材

基础毒理学
Basic Toxicology

（第二版）

主　编　周志俊

副主编　张天宝　唐　萌

主　审　金泰廙

编　委（按编写章节顺序排序）

周志俊（复旦大学）
王素华（包头医学院）
洪　峰（贵阳医学院）
常秀丽（复旦大学）
朱勇飞（湖南师范大学）
韩光亮（新乡医学院）
杨惠芳（宁夏医科大学）
唐　萌（东南大学）
吴　庆（复旦大学）
牛　侨（山西医学院）
范奇元（遵义医学院）
张天宝（第二军医大学）

复旦大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

基础毒理学/周志俊主编. —2 版. —上海:复旦大学出版社,2014.8
预防医学国家级教学团队教材
ISBN 978-7-309-10859-0

Ⅰ. 基… Ⅱ. 周… Ⅲ. 毒理学-医学院校-教材 Ⅳ. R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 164727 号

基础毒理学(第二版)
周志俊 主编
责任编辑/傅淑娟

复旦大学出版社有限公司出版发行
上海市国权路 579 号 邮编:200433
网址:fupnet@fudanpress.com http://www.fudanpress.com
门市零售:86-21-65642857 团体订购:86-21-65118853
外埠邮购:86-21-65109143
常熟市华顺印刷有限公司

开本 787×1092 1/16 印张 19 字数 462 千
2014 年 8 月第 2 版第 1 次印刷

ISBN 978-7-309-10859-0/R・1404
定价: 48.00 元

第二版前言

由复旦大学出版社出版的《基础毒理学》第一版教材从2008年至今已经5年余。作为一本"简化版"的基础毒理学教材，在使用的学校反映都不错，当然也发现一些问题。《基础毒理学》第二版在此基础上进一步完善提高。

第二版与第一版相比，我们的指导思想没有变，继续强调基本理论、基本知识的讲授和基本技能的介绍。在章节安排上，听取了部分教师意见将原先的第四章非特异性靶器官毒作用折分成几章，并增加其内容的广度与深度，以与实际教学安排相对应。

如在第一版前言中所说，教材的编写过程就是一个学习的过程。参与编写的各位老师付出了大量心血，但也收获颇丰。限于我们水平和能力，新版教材肯定仍然会存在错误或不当之处，敬请老师、同学们提出宝贵意见，以便我们改正。

《基础毒理学》再版得到了复旦大学公共卫生学院的支持。对于学院的支持以及各位编写老师和学术秘书黄敏的辛勤劳动，在此一并表示感谢！

编　者

2014年7月

第一版前言

《基础毒理学》教材是复旦大学出版社和复旦大学公共卫生学院在2005年根据教育部高等教育司《关于申报"普通高等教育'十一五'国家级教材规划"选题的通知》精神，申请获批准出版的教育部"十一五"国家级规划教材。从申请立项到正式出版经历了两年时间。可以说，没有教育部的文件精神，没有复旦大学教务处和复旦大学出版社的强力推动支持，这本书是不会问世的。

毒理学作为预防医学的基础学科，在我国教学已经有近30年的历史。人民卫生出版社从1987年出版第一版规划教材以来，至今已经有了第五版。北京大学公共卫生学院和四川大学华西公共卫生学院都出版过相关的教材。复旦大学(原上海医科大学)公共卫生学院从20世纪80年代末自编了《基础毒理学》内部教材，在预防医学、药学专业教学中使用。众所周知，教材是体现教学内容和教学要求的知识载体，是进行教学的基本工具，因此，不同学校，甚至不同教师在毒理学教学中根据自己的教学计划、教学重点选择不同教科书是正常现象。现在复旦大学出版社出版的"十一五"国家级规划教材《基础毒理学》为毒理学教学的教材选用又多了一份选择。这是我国高等教育中教材出版百家争鸣、百花齐放特色的具体体现。

毒理学发展至今，不再是简单地研究化学物所造成的生物体不良效应的一门学科。现代毒理学不仅以化学物为研究对象，阐明化学物与生物体之间的交互作用及造成的不良效应和剂量-反应(效应)关系，也是以化学物作为工具，研究机体内部的正常生理、生化及调节机制，从而认识自我。毒理学是一门涉及领域广泛的学科，它既是一门有明确服务对象的应用科学，又是化学工业、药理、法医、预防医学、环境保护、生态学等专业的基础科学。基于这样的认识，我们在编写过程中，认真学习、借鉴其他教材的成功经验，参考相关毒理学专著，注意教材与专著的异同，力求以本科生必须掌握的毒理学基础理论、基本知识和基本技能为重点，简明扼要地阐述毒理学的概念、原理和应用。力求用较少的文字将基本理论、基本知识讲清楚，对基本技能有介绍。在编写框架上，强调了"基础"，以描述毒理学中的毒性(toxicity)、机制毒理学中的危害(hazard)和管理毒理学中的危险(risk)为主线，以剂量-反应(效应)关系为核心，系统介绍毒性发生、发展过程，以及毒性评价、控制和管理等。在内容上，增加了危险性交流的相关内容，减少了具体试验方法的介绍，只保留了目前本科教学中经常使用的实验方法。从而，使《基础毒理学》更为精练，便于学生学习。

在教材编写过程中，复旦大学教务处、复旦大学公共卫生学院和复旦大学出版社领导给予了大力支持，在此表示衷心的感谢。

对教师来讲，编写教材也是一个学习提高的过程，通过反复的交流讨论，我们对以前一些习以为常的现象有了进一步准确的、统一的认识。由于我们水平和能力有限，本教材肯定存在不少错误或不当之处，敬请各位老师、同学提出宝贵意见。

作　者

2007年12月

复旦大学出版社向使用本社《基础毒理学(第二版)》作为教材进行教学的教师免费赠送多媒体课件，该课件有许多教学案例，以及教学PPT。欢迎完整填写下面表格来索取多媒体课件。

教师姓名：……………………………………

任课课程名称：……………………………………

任课课程学生人数：……………………………………

联系电话：(O)…………………… (H)…………………… 手机：……………………

e-mail 地址：……………………………………

所在学校名称：……………………………………

邮政编码：……………………………………

所在学校地址：……………………………………

学校电话总机(带区号)：……………………………………

学校网址：……………………………………

系名称：……………………………………

系联系电话：……………………………………

每位教师限赠多媒体课件一份。

邮寄多媒体课件地址：……………………………………

邮政编码：……………………………………

请将本页复印完整填写后，邮寄到上海市国权路579号

复旦大学出版社傅淑娟收

邮政编码：200433

联系电话：(021)65654719

e-mail：shujuanfu@163.com

复旦大学出版社将免费邮寄赠送教师所需要的多媒体课件。



第一篇　理论部分

第一章　毒理学概述 ······ 002

第一节　毒理学基本概念 / 002

第二节　毒理学研究范畴 / 007

第三节　毒理学研究方法 / 012

第四节　毒理学历史与发展 / 015

第五节　毒理学在预防医学中的应用 / 021

第二章　毒物在体内的过程 ······ 024

第一节　毒物的吸收、分布和排泄 / 024

第二节　毒物的生物转化 / 038

第三节　毒物动力学 / 047

第三章　毒作用及其影响因素 ······ 053

第一节　毒效应谱和毒作用类型 / 053

第二节　毒作用机制 / 055

第三节　毒性作用影响因素 / 077

第四章　常规毒性测试及其替代实验 ······ 085

第一节　常规毒性及描述参数 / 085

第二节　经典实验方法 / 088

第三节　替代实验 / 097

第五章　外源化学物的致癌作用 ······ 100

第一节　化学致癌物的分类 / 100

第二节　化学致癌机制 / 103

第三节　化学致癌的影响因素 / 109

第四节　外源化学物致癌性的测试和评价 / 111

第五节　外源化学物致癌的预防 / 114

第六章　遗传毒性 ······ 116

第一节　概述 / 116

第二节　遗传毒性的形成机制及影响 / 119

第三节　遗传毒性的检测方法 / 125

第七章　生殖毒性与发育毒性 ······ 127

第一节　概述 / 127

第二节　生殖毒性与发育毒性机制 / 135
第三节　生殖毒性与发育毒性评价 / 138
第八章　靶器官毒理学 …… 149
第一节　肝脏毒理学 / 149
第二节　肾脏毒理学 / 155
第三节　免疫毒理学 / 159
第四节　神经和行为毒理学 / 163
第五节　其他系统毒理学 / 166
第九章　毒理学安全性评价、健康危险度评定和危险管理 …… 175
第一节　化学物的毒理学安全性评价 / 175
第二节　健康危险度评定 / 178
第三节　健康危险度评估的发展方向 / 188
第四节　危险管理和交流 / 189
第十章　毒理学应用及分支 …… 193
第一节　卫生毒理学 / 193
第二节　药物毒理学 / 203
第三节　生态毒理学 / 206
第四节　其他分支 / 210
第五节　纳米毒理学 / 214
第十一章　毒理学实验基础 …… 222
第一节　实验设计原则 / 222
第二节　毒理学实验结果的统计分析 / 225
第三节　整体动物实验 / 227
第四节　离体器官实验 / 234
第五节　细胞实验 / 236
第六节　分子生物学实验 / 245
第七节　毒理基因组学 / 253
第十二章　毒理学实验室质量管理 …… 256
第一节　毒理学实验室质量管理体系的产生背景和意义 / 256
第二节　良好实验室规范 / 264
第三节　GLP 质量管理体系在我国的应用现状和展望 / 273

第二篇　实验部分

实验一　实验动物生物材料的采集及解剖 …… 282
实验二　急性毒性实验常用染毒方法及半数致死浓度的测定 …… 284
实验三　鼠伤寒沙门菌回复突变实验 …… 288
实验四　动物骨髓细胞染色体畸变分析 …… 291
实验五　小鼠骨髓多染性红细胞微核实验 …… 293
实验六　小鼠精子畸形实验 …… 294
实验七　大鼠致畸实验 …… 296

主要参考文献 …… 299

第一篇　理论部分

第一章　毒理学概述

毒理学(toxicology)一词由希腊文 toxikon 和 logos 两词组合演变而来,原文含义是描述毒物的科学。毒理学是研究化学物对生物体的毒性和毒作用机制的一门学科,目的是了解化学物与生物体之间的相互作用关系,阐明化学物对生物体引起的有害效应性质和剂量-反应(效应)关系,确定化学物对生物体引起有害效应的能力,为指导化学物的安全使用和中毒防治提供依据。

毒理学的迅速发展源于人们对人类社会接触各种化学物后是否引起健康损害的担忧。随着人类社会生产的发展和生活条件的改善,人们在从事生产或日常生活中接触化学物的品种和数量愈来愈多。全世界登记的化学物已超过 800 万种,常用的也有 7 万～8 万种。在人的一生中不可避免地可通过生产、使用或滥用(事故或自杀)短时接触化学物,也可通过各种环境介质(水、土壤、食品污染等)长期持久地接触化学物。对人体来说,这些化学物是从外界环境中摄入,而非机体内源产生,它们具有生物活性,在一定条件下直接或间接损害人的健康,所以被称为外源化学物(xenobiotics)。

基于对人类影响的考虑,毒理学一般以实验动物为研究对象,研究实验动物接触外源性化学物后发生的毒效应,并用这些研究结果预测、外推到人,以便最终保护人类健康。尽管实验动物多为哺乳动物,其解剖学、生理学、生物化学与人类有许多共性的一面,但在生理、生殖、代谢等进化方面仍有许多本质区别,使得这些实验结果外推至人时常与真实情况存在一定差异。这又推动了以人自身为研究对象的临床毒理学或人群毒理学的发展。它是以事故接触或职业、环境接触的人群为研究对象,观察不同接触后对健康的早期影响,由于没有种属外推的问题,故对一些已经有广泛人群接触的化学物的毒理学研究特别看重。此外,随着人们环境保护意识的增强、对人类所在的生态环境的关注,生态毒理学的发展也非常迅速。生态毒理学(ecotoxicology)是研究有毒有害因子对生态环境中各种生物的损害作用及其机制的科学。有的学者认为这里的生物应当包括人,也有的学者认为不包括人,且用生态环境中非人类生物来限定。总之,不论如何发展,毒理学始终用一些模式生物(离体或整体)研究化学物对之的影响,并用其研究结果预测对另外一些生物(通常是高级的、不容易作为研究目标对象,如人)的影响。

第一节　毒理学基本概念

毒理学研究对象是化学物,俗称毒物。事实上,化学物的有毒或无毒是相对的,并不存在

绝对的界线。任何一种化学物在一定条件下可能是有毒的，而在另一条件下则对人的健康是安全无毒的。著名瑞士毒理学家 Paracelsus 曾说："化学物只有在一定的剂量下才具有毒性"，"毒物与药物的区别仅在于剂量"。中国古代也有一句习俗语"万物皆毒唯量焉"。因此，化学物的有毒或无毒主要决定于剂量，只能以产生毒效应所需的剂量大小相对地加以区别。实际上，几乎所有的化学物，当它进入生物体内超过一定量时，都能产生不良作用，即使是安全的药物或食品中的某些主要成分，如果过量给予，均可引起毒效应。例如，各种药物一旦超过安全剂量均可产生毒效应，严重者会引起中毒。食盐一次服用 15～60 g 即有害于健康，一次用量达 200 g 以上可因其吸水作用导致电解质严重紊乱引起死亡。

一、毒物与毒性

所谓毒物(poison，toxicant)通常是指在一定条件下以较小的剂量作用于生物体，扰乱破坏生物体的正常功能，或引起组织结构的病理改变，甚至危及生命的一些外源化学物。由于剂量决定一切，通常会认为，凡是在日常可能接触的途径和剂量，即能对机体发生损害的外源化学物称为毒物，像油、盐、醋等生活用品就不会归为毒物范畴了。

目前，毒理学研究关注的常见外源化学物，包括以下 9 类。①工业化学物，如原料、中间体、辅助剂、杂质、成品、副产品、废弃物等。②环境污染物，如工业生产中排放入环境的废气、废水和废渣，以及农田使用农药对环境的污染。③食品中的有害成分，如天然毒素、食品变质后产生的毒素、不合格的食品添加剂和防腐剂等。④农用化学物，如杀虫剂、杀菌剂、化肥、除草剂、植物生长激素等。⑤生活日用品中的有害成分，如烟酒嗜好品、化妆品、洗涤剂、染发剂、蚊香的某些组分。⑥生物毒素(toxin)，如动物(蛇毒)、植物(蕈毒)和细菌毒素。⑦医用药物，包括兽医用药。⑧军用毒剂，主要指化学武器。⑨放射性核素。这些化学物多数是人类在生产和生活中不可缺少或无法避免的物质，它们可以通过不同途径进入人体，给人们带来潜在危害，在一定条件下损害人的健康。

毒性(toxicity)通常是指某种化学物引起机体损害的能力。毒性的概念是抽象的，是化学物本身固有的特性。随着观察指标的不同，毒性的描述范围很广。在实验条件下，毒性是指化学物引起实验动物某种毒效应所需的剂量(浓度)。化学物的毒性大小是与机体吸收该化学物的剂量、进入靶器官的剂量和引起机体损害的程度有关。因此，化学物毒性大小，通常可用剂量-反应(效应)关系来表示。引起实验动物某种反应(效应)所需剂量愈小，则毒性愈大；反之亦然。不同化学物对生物体引起毒效应所需的剂量差别很大。有些化学物，只要接触几微克即可导致死亡，常被称为极毒化学物；另一些化学物，即使给予几克或更多，也不会引起有毒效应，常被认为是实际无毒的化学物。高毒性化学物仅以小剂量就能引起机体的损害，低毒性化学物则需大剂量才能引起机体的损害。在同样剂量水平下，高毒化学物引起的机体损害程度较严重，而低毒性化学物引起的损害程度往往较轻微。

二、接触与剂量

接触(exposure，有时翻译为暴露)是指可以影响人类健康的一些因素或物质(exposure is a substance or factor affecting human health)。在公共卫生领域通常是指人体表(皮肤、口腔、呼吸道等)与环境介质(水、土壤、空气)有害物之间的联接(contact between a substance in environmental medium and the surface of human body)。一般将机体摄入后的化学物的量称为剂量。谈到人群接触的含义常包括接触水平和持续时间两方面含义。在动物实验或离体实

验中，常用染毒或给药(administration)一词。常见的染毒方式有呼吸道、消化道、经皮和注射等。

化学物只有与机体接触或进入体内，并且达到一定的量才能引起机体的不良反应。通常化学物进入机体内最主要的途径是消化道(摄入)、呼吸道(吸入)以及皮肤吸收，有时还有其他途径。能够迅速进入血流的毒物通常引起的毒作用最大。一般吸收速度依静脉、吸入、腹膜、皮下、肌肉、皮内、经口、皮肤顺序递减。用于溶解化学物的溶剂不同以及规格不同可以大大影响吸收速率，有时不同给药途径所致毒性有天壤之别。工业毒物接触主要以呼吸道和皮肤为主，而事故或自杀等原因则以口服为主。如果不同途径接触同样的量其效应相同，则提示该化学物吸收非常迅速与完全。

在毒理学中有内剂量、外剂量和生物有效剂量等剂量概念。接触剂量(exposure dose)或外剂量(external dose)是指环境中机体接触毒物的总量。体内负荷(body burden)或内剂量(internal dose)表示通过各种途径吸收进入体内血循环的外来化学物及其代谢产物的含量。例如，血铅和血镉浓度可分别作为铅和镉的内剂量，尿中扁桃酸和三氯乙酸浓度可分别估测接触苯乙烯和三氯乙烯的内剂量。靶剂量(target organ dose)或生物有效剂量(biological effective dose)是指到达机体的特定效应部位(组织、细胞和分子)并与其相作用的外来化学物代谢产物的含量。虽然生物有效剂量能真正反映化学物对机体发生效应的剂量，但剂量的估测需详细的毒物代谢动力学资料，在实际使用时较为复杂。目前，多用替代指标(surrogate)的浓度(或强度)来推测效应部位的浓度，如测定血中化学物与血红蛋白或白蛋白形成的加合物及白细胞 DNA 加合物等作为接触的生物标志，代替靶组织 DNA 与化学物的加合物，间接估测效应剂量。

在一次或少量次数给药时，我们可以通过特定方式描述实验动物接受化学物的量。此时剂量单位多用实验动物单位体重(kg)接受多少化学物量(mg)表示。这实际上已经指示进入实验动物体内量。而在较长时间染毒或人群研究中，我们很难精确算出摄入多少量，此时常用环境介质中存在化学物的量来表示剂量，如空气中某化学物浓度(mg/m^3)、饮水中某化学物浓度(mg/L)、饲料中某化学物浓度(mg/kg)。此时要估计实际摄入量必须结合消耗的空气、水和饲料量来进行。在剂量表示时，有学者提出考虑到动物与人的种属差异，最好以单位体表面积(m^2)用了多少化学物量(mg)来表示，这样更加合理。

在剂量表示中还有一个重要的指标是累计剂量，是指在一定的接触时间内实验动物或人总计给予或摄入的化学物量。简单情形有短时间接触大剂量和长时间接触小剂量，两者接触的累计剂量相同，出现的不良效应是否相同并无完全定论，在一定剂量范围内，它们的效应是相同的。这通常取决于出现的不良效应性质和引起这一效应变化的化学物阈限值。

三、效应与反应

效应(effect)是指外源性化学物对生物体作用所引起的生物学改变，这类生物效应的强度是连续增加或减少的变量，可以用计量数据表示其强度，称量效应(graded effect)。这就是统计学中所说的计量资料，如化学物引起酶活力的改变、炎症程度的增加、心率的改变等。

反应(response)是某些效应只能以有或无、正常或异常、阴性或阳性表示，称为质效应(quantal effect)。这是统计学中的计数资料，如是否死亡、是否发生肿瘤、是否出现畸胎等。

效应可以按照设定的标准界限转化为反应，如将白细胞计数按照一个设定的界值分为低

下、正常。这一界值的设定通常会根据不同研究目的、依据效应的分布状态来确定。这就是统计学中的计量与计数资料的转换。

四、生物效应与生物标志

生物体是一个复杂的"开放"系统,通过许多生理功能和生化反应与环境交换物质和能量,并保持动态平衡。生物体对外源化学物的作用具有一定的代偿能力,以维持体内环境的平衡稳定。但是机体的代偿能力是有限的,如果生物体超量接触化学物,代偿功能可受损害,机体出现各种功能障碍、应激能力(stress)下降、维持体内稳态(homeostasis)能力降低,以及对其他环境有害因素的敏感性增高等。接触化学物后,各个体出现的效应并不都是完全一样的。一般可分为5种情况:①所接触的化学物(或代谢物)在体内的负荷虽有增加,但并不引起代谢、生理、生化或其他功能活动的改变;②体内负荷进一步增加,引起了代谢、生理功能或组织器官形态结构的轻微变化,但此种改变没有病理生理学意义;③负荷水平足以导致有病理生理意义的改变,但尚未出现明显的临床症状;④个体因过量接触健康受到严重损伤,出现临床疾病;⑤严重中毒或死亡。

化学物的有害效应(adverse effect)或毒效应(toxic effect)是指进入体内的化学物其代谢产物达到一定剂量,并与靶(器官、组织、细胞、分子)相作用所引起的不良生物学改变。例如,有机磷酸酯农药在生物体内抑制胆碱酯酶活性,临床上出现瞳孔缩小、肌肉颤动、大汗、肺水肿等毒效应。化学物引起毒效应的强度范围很宽,包括早期生物学效应、生理、生化正常功能的改变、器官组织的病理改变、临床征象、疾病甚至死亡。从预防医学的观点研究化学物对生物体的有害效应,应将这些有害的生物学改变看作化学物对生物体生产毒效应的连续过程。采用灵敏可靠的生物学指标作为观察终点(end point),以便早期识别轻微可逆的有害效应,这对预防化学物中毒具有十分重要的意义。

近年来,对几百种化学物的毒效应观察,发现在低剂量时一些化学物作用方向与高剂量的表现完全相反,从而出现了毒物兴奋效应(hormesis)概念。毒物兴奋效应的现象发源于抗生素的研究,德国学者 Schulz 注意到高剂量抗生素抑制细菌生长,而剂量低到一定程度反而促进细菌生长。后来许多实验发现辐射、某些化学物都有类似作用。其含义是在一定剂量时化学物可引起一定的毒效应(激发/抑制),而在低于未可见的有害作用水平(NOAEL)剂量水平以下时却表现为相反的作用(抑制/激发)。化学物低剂量时产生的毒物兴奋效应,是由于机体作出了过度补偿(over compensation),是机体的过激反应(overshoot)或称为反弹(rebound)所致。一般认为,毒效应是化学物与机体交互作用的结果,但并非所用化学物都有毒物兴奋作用;毒物兴奋作用多数是对生物体有益的,但并非所有化学物都是如此。

随着分子生物学和分子毒理学的发展,以及化学物对机体免疫功能、神经行为、遗传及生殖过程有害影响的研究,毒理学者正在使用极其敏感的方法,选择化学物引起毒效应的早期生物学指标作为观察终点,发现外来化学物对健康的危害。凡是能检测化学物引起有害效应的生理、生化、免疫、细胞分子变化的生物学指标,又可称为效应的生物标志(biomarker of effect)。

生物标志(biomarker)是机体与环境因子(物理、化学或生物学的)相互作用所引起的任何可测定的改变,包括环境因子在体内的变化,以及机体在整体、器官、细胞、亚细胞和分子水平上各种生理、生化改变,这些改变必须有明确的生物学意义。生物标志一般分为接触标志物、效应标志物和易感性标志物3类。

五、联合作用

毒理学研究对象常限于某一化学物。人们虽已经认识到人类现实生活接触化学物的复杂性、多重性，但真正研究多个化学物之间的联合作用的较为简单的手段并不多。理论上，目前对联合作用的类型已经有一个共同认识。联合作用(combined action)是指两种或两种以上的化学物同时或前后进入机体所产生的生物学作用。联合作用有 4 种类型，包括：①独立作用(independent effect)，两种或两种以上的化学物同时或先后与机体接触，由于其各自毒作用的受体、部位、靶器官等不同，且其所引起的生物学效应也不互相干扰，从而表现为各化学物的各自毒效应，此种情况称为独立作用。②相加作用(additive effect)，同时接触几种化学物后所产生的生物学作用(或毒效应)强度，表现为各单一化学物分别产生的效应强度的总和。③协同作用(synergistic effect)，两种或两种以上化学物同时或前后相继进入机体，表现出的毒效应强度大于各自单独作用之和，该作用称为协同作用。④拮抗作用(antagonistic effect)，两种化学物同时或先后给予机体，其中一种化学物可干扰另一种化学物原有的生物学作用使其减弱，或两种化学物相互干扰，使混合物的生物学作用或毒作用的强度低于两种化学物中任何一种单独给予机体时的强度，这样的联合作用称为拮抗作用，亦称减毒作用。

虽然，理论上我们能清楚地将联合作用划分为上述类型，但实际研究却是非常困难，需要有好的实验设计去说明、验证。目前有一些数据模型用于预测混合物的联合毒性，如浓度相加模型、独立作用模型、相互作用模型。这些模型的使用都有一定的局限性。

六、毒性的时程变化与反复低剂量接触后耐受

虽然我们已经认识到，有害效应或毒效应是进入体内的化学物及其代谢产物达到一定剂量后与靶(器官、组织、细胞、分子)相互作用所引起的不良生物学改变，但还没有考虑时程(time course)的概念。事实上，给予不同化学物后，因吸收的快慢、是否代谢活化、特定病损的进展速度等因素不同，会在给药后不同时间出现不良效应。这是有时在不同时间观察点会出现不同甚至相互矛盾的生物效应的一个重要原因。为什么在传统的急性毒性研究中，需要有足够长的实验观察时间，就是不要漏掉晚期出现的不良效应。比较完整的毒理学研究应当包括给药后某效应随时程变化的规律，而不是简单的在某一特定观察时点效应与剂量的变化关系，除非有足够数据提示在这一时点观察已经完全有代表性了。

还有一个概念是时间毒理学(chronotoxicology)，这很容易与给药后毒效应不同时程变化相混淆。时间毒理学源于时间生物学，研究化学物与机体内在的生物节律相互作用的规律。简单地说，时间毒理学研究在实验对象不同生物节律状态下给予化学物后不良效应出现的变化异同，研究给予化学物后对实验对象生物节律生理变化的影响。

反复接触低剂量的化学毒物后机体出现的另外一个现象是耐受(tolerance)。现在发现耐受是毒理学中的一个较为普遍的现象，所谓耐受是指实验动物或人在低剂量接触某一化学物一段时间后，再次接触较高剂量该化学物时不出现明显的首次接触后引发的不良效应的现象。对耐受研究的经典的案例是有机磷酸酯，实验动物反复接受小于致死剂量的有机磷酸酯时，会表现出典型的中毒症状及胆碱酯酶活力降低，但当继续接受一些时间后，症状会减轻甚至消失。在职业卫生工作中也有许多发现，接触同样水平工业毒物的新老工人在效应方面有明显差别，新工人出现的症状与体征较多，在汞、铅、镉等的接触者中，这一现象较为明显。难以完全用工人的选择效应(selective effect)作解释，而很可能与金属毒物的吸收、蓄积、排泄的动力

学有关，也可能与金属硫蛋白诱导合成有关，还可能与机体的其他适应性调整有关。新近研究发现，耐受现象的机制非常复杂，用一种指标考量可能是耐受，但用另外一种指标考量时仍发现有不良作用。一般认为，耐受是机体对外界的适应似为一种保护作用，但可能掩盖了潜在的毒作用，故在毒理学研究中须予以特别注意。

第二节　毒理学研究范畴

毒理学发展至今，不再是简单地研究化学物所造成的生物体不良效应的一门学科。现代毒理学不仅以化学物为研究对象，阐明化学物与生物体之间的交互作用及造成的不良效应和剂量-反应(效应)关系，也以化学物作为工具，研究机体内部的正常生理、生化及调节机制，从而认识自我。近代毒理学的研究理论和研究方法已广泛用于寻找高效低毒的农药、选择更为安全的药物和食品添加剂，研制化学物的特效解毒剂，化学毒品的管理以及控制工业化学物、环境污染物等对人类健康引起的危害。毒理学是一门涉及广泛领域的学科，它既是一门有明确服务对象的应用科学，又是化学工业、药理、法医、预防医学、环境保护、生态学等专业的基础科学。

毒理学研究基本可以分为描述性、机制和管理毒理学研究 3 个方面，每一方面有其独特的特征，但又相互联系，危险度评价是三者之间关系的核心交叉之处(图 1-1)。这一划分涵盖了毒理学发展的各种分支的内容。

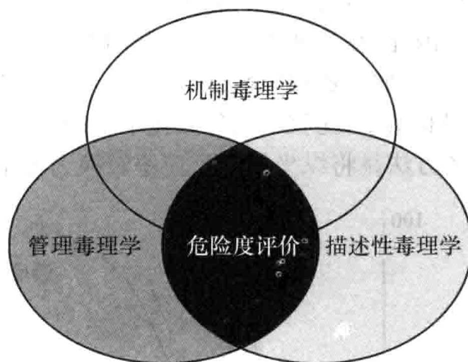


图 1-1　毒理学研究范畴示意

一、描述性毒理学

毒理学的首要任务是对外源化学物可能引起的接触者的健康危险作出评价，通常称为毒理学安全评价。研究通常模拟人的接触途径、接触时间等条件，以及关心的效应出现的时间变化规律，选择合适的动物模型、给药方式和期限，在适当的观察期内，观察化学物对动物的一般毒性和特殊毒性，如致突变作用、致癌作用、致畸作用等，发现在什么剂量下引起何种不良效应。这样的工作属于描述性毒理学(descriptive toxicology)范畴。描述性研究主要是通过毒性测试，为安全性评价、危险度分析管理提供数据，也为机制研究提供合理线索。

为了保证毒理学数据的可比性，毒理学实验方法要保持一致，目前 OECD 公布的毒理学实验方法指南是国际接受度最好的。我国涉及化学品管理的不同政府部门颁布的毒理学试验方法指南或标准，都有 OECD 颁布的指南“影子”或者直接引用了指南的部分内容，这些标准(指南)虽有文字表述差异，但其核心内容基本一致。当然，光靠指南(标准)还不够，要获得真实可靠可信数据，实验室的质量管理是不可或缺的环节。只有这样，才能保证获得的数据在危险度评价应用时能合理推测人的情况。

通过描述性研究，我们可以掌握化学物引起某一毒效应的剂量-效应或反应的关系。剂量-效应或反应的关系的描述是描述毒理学，甚至是毒理学的核心。剂量-反应(效应)关系(dose-response or effect relationship)是指外源化学物作用于生物体时的剂量与引起生物作

用的发生率或剂量强度之间的相互关系。随着剂量与计数资料的转换，剂量-效应关系可转换为剂量-反应关系。在公共卫生领域关注剂量-反应关系更多一些。

由于外源化学物的剂量是决定毒作用大小的主要因素，任何生物体都有个体易感性差异，接触群体中的不同个体不会对同一化学物的同一剂量发生同样的效应。因此，化学物引起某种生物作用的发生率或剂量强度，是随剂量增加而增加，机体出现某种生物作用，如要肯定其某因果联系，则必须存在明确的剂量-反应(效应)关系，否则不能肯定。

接触群体中的个体对某种毒效应的发生频率，可能是正态分布、对数正态分布或其他分布。如果以某种毒效应发生率为纵坐标，以剂量为横坐标，即可构成剂量-反应曲线。大多数毒理学的剂量-反应关系呈对称的"S"形曲线或不对称"S"形曲线，如将不对称"S"形曲线的剂量以对数表示，也可成为对称的"S"形曲线(图 1-2)。

在低剂量范围内，随着剂量的增加，毒效应发生率增加较为缓慢；而在主要的剂量-反应曲线部分，随剂量增加，毒效应发生率急速上升，特别是在曲线的中点附近，斜率(slope)最大，剂量略有变动，反应即有较大增减；而当剂量继续增加时，毒效率的发生率又趋向和缓(图 1-2)。因此，在毒理学资料中，常用引起 50%动物反应率的剂量作为评价外来化学物毒性的主要参数，如半数效应剂量(ED_{50})、半数中毒剂量(TD_{50})和半数致死剂量(LD_{50})。为了计算可信限和斜率，比较不同外来化学物的毒性参数，可将对称"S"形剂量-反应曲线转化成直线，转换的方法是将纵坐标的反应率转换为概率单位(probit unit)，见图 1-3。

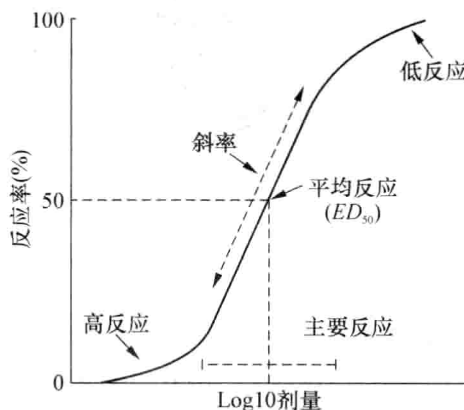


图 1-2　剂量-反应关系曲线(S形)

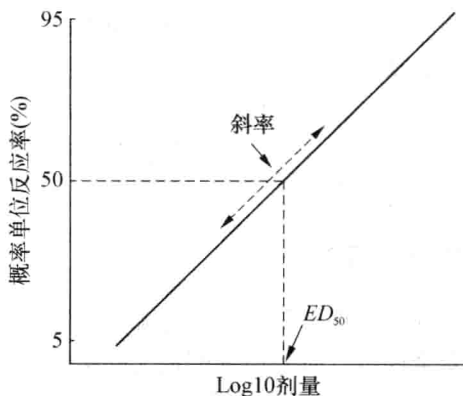


图 1-3　剂量-反应关系曲线(直线型)

随着人们对低剂量或极低剂量的效应研究，发现剂量反应关系的曲线非常复杂，还存在"U"形、"J"形或指数型等形式。低剂量研究使人们注意到了，在一定低剂量范围内，其化学物作用的方向完全与高剂量相反，出现了毒物兴奋效应现象。

根据剂量-反应关系资料，可以证实接触外源化学物引起某种毒效应之间的因果联系。通过对剂量-反应关系曲线的分析，可以确定引起毒效应的阈剂量(threshold dose)或无作用剂量(no-effect dose or level)、计算 ED_{50}及可信限和斜率等参数。在剂量-反应关系的资料应用时，必须注意观察的指标不同，其关系曲线可完全不同。如果应用不当，往往会带来严重偏差，如将急性毒性的剂量-反应关系代表慢性毒性的剂量-反应关系。

二、机制毒理学

外源化学物的毒作用机制是毒理学研究的重要内容之一，也是毒理学基础理论探讨的重

要部分。通过生物整体、器官水平、细胞或亚细胞水平和分子水平的研究，不但能深入揭示化学物的毒作用部位、性质和过程等基本规律，阐明化学物对生物体有害作用的发生和发展，而且对探讨中毒的早期诊断指标和防治措施也有重要意义。研究外源化学物如何进入体内及在体内分布与排泄、如何经各种生物膜进入靶部位、如何与靶分子发生反应引起不良效应，这一系列过程都是机制毒理学(mechanistic toxicology)研究范畴。机制毒理学研究化学物引起毒效应的细胞、生化、分子机制，其结果在实际应用中非常重要。

化学物对生物体的有害作用是在一定条件下与机体交互作用的结果，与化学物本身、接触剂量和生物体特征都有明确关系。化学物的结构可决定其特有的物理性质和化学性质，理化性质和化学活性又决定化学物固有的生物活性。研究掌握化学结构与毒作用关系的规律，有助于预测新化学物的生物活性，推测毒作用机制。有关化学结构与毒作用关系的研究，近年虽已发展应用化学物的某些理化参数，通过回归分析方法定量地找出化学结构与其毒效应之间的相互关系，称为量化构效关系(quantitative structure activity relationship, QSAR)。但是，QSAR 研究方法尚有许多问题有待解决，应用还有一定限制。因此，掌握一些相对的定性的化学结构和理化性质与毒效应关系的规律，将对化学物毒作用的认识有一定帮助。

有机化学物中的脂肪族烃类多具有麻醉作用，一般随其碳原子数增多而作用增强(甲烷、乙烷例外)，但达 9 个碳原子之后，随碳原子数增多而麻醉作用减弱。烃类的不饱和程度越高，化学活性越活泼，因而毒性也大。例如，碳链长度相同时，其毒性:炔烃＞烯烃＞烷烃。卤代烷烃均较其母体烃的毒性大，卤烃化学物的毒性一般按氟、氯、溴、碘的顺序而增强，卤素原子数愈多，毒性也愈大。通常认为，无机化学物的毒性与溶解度有关，如硫酸钡不溶于水，基本无毒，而氯化钡易溶于水，则毒性很强；三氧化二砷(砒霜)易溶于水，为剧毒，三硫化二砷难溶于水，毒性非常小，两者毒性大小差 3 万倍左右；铅化合物在血中溶解度的大小顺序为氧化铅＞金属铅＞硫酸铅＞碳酸铅，其毒性大小与溶解度完全一致。化学物的挥发度与熔点、沸点、蒸汽压等有关，挥发度大的化学物在空气中形成蒸汽的浓度高，引起中毒的危险性大。例如，苯和苯乙烯的 LC_{50} 均为 45 mg/L，苯的挥发度为苯乙烯的 11 倍，其中毒危险性要比苯乙烯大得多。

外源化学物从环境进入机体到产生有害效应，可分为 3 个阶段：①接触相(exposure phase)，是指化学物的组成、理化性质、接触浓度或剂量，以及进入体内的途径等；②毒物动力学相(toxicokinetics phase)，是化学物进入体内的吸收、转运、分布、蓄积、生物转化和排出过程；③毒效动力学相(toxicodynamics phase)，是指化学物的活性形式到达靶组织，作用于受体，与其他分子结合并产生毒效应。外源化学物对哪些靶器官或组织产生有害作用，决定于化学物的结构和理化性质，以及与受体的亲和力。外源化学物引起毒效应的性质和毒性强度，与该化学物在体内的生物转化及活性物质在靶组织的生物效应剂量有关。

机制性研究资料在证实实验动物观察到的效应，如肿瘤、出生缺陷，是否直接与人有关时非常有用。如有机磷酸酯化学物的毒性机制主要是抑制乙酰胆碱酯酶，它们在人、大鼠、昆虫都是一样的，唯一区别是不同种属的生化转化差异。又如糖精致动物膀胱癌，但在正常使用情况下对人不会致癌，因为机制研究发现致动物膀胱癌是在极大剂量下糖精沉积在尿中形成结晶所致。

机制性研究资料在药物研发过程中也非常有益，如臭名昭著的反应停(thalidomide)在 20 世纪 60 年代造成了巨大人类悲剧，但一名以色列医生发现“反应停”对麻风结节性红斑有很好的疗效，机制研究发现它可以作用于与血管形成有关的基因，据此作为治疗某些感染性疾病

(麻风、AIDS)、炎性疾病和肿瘤药物,目前已经取得实质性进展。1998 年,美国 FDA 批准反应停作为治疗麻风结节性红斑的药物上市,活性更强且无致畸性的反应停衍生物也已获准上市。在生理、药理、细胞生物学、生物化学的基础研究中,毒理学机制研究也有重要作用,如对 DDT 和河豚毒素的毒性研究,认识了中枢突触膜的离子梯度特征。分子生物学技术的应用为认识动物与人的毒性差异原因提供了有用的工具。毒理基因组学的发展为识别易感人群、治疗个性化提供了基础。

机制毒理学研究非常注重新技术、新方法的应用,随着生命科学技术的发展,毒理学在细胞的信号通路、表观遗传修饰等方面的机制研究,又推动了对生命现象在分子水平上的认识。

三、管理毒理学

为保证人们在生产和使用化学物时的健康安全,对外源化学物的毒性和潜在危险进行定性或定量的评价,并在其基础上,结合考虑社会、经济、文化发展等因素,作出管理决策,是管理毒理学(regulatory toxicology)的研究范畴。危险度评价是管理毒理学的核心基础,它是基于描述毒理学、机制毒理学资料进行的。

人们对化学物长期低剂量接触危害认识的深入,特别是化学物的所谓"三致"作用,促进了危险度评价的发展。我们不仅需要毒理学实验以发现可能潜在的危害,更需要系统全面的毒理学研究,以免遗漏化学物可能存在的一些危害。这推动了化学物安全评价的发展,一些政府机构或学术团体根据不同化学物的人群接触特征颁布了不同的安全评价程序,但不论如何,其评价程序的原则、核心都没有变化,用支出合理的可信实验,最大限度发现化学物不同方面的毒性作用。

所谓化学物的"三致"作用,是指化学物对生物体遗传物质的诱发突变(mutagenesis)、致癌作用(carcinogenesis)和致畸作用(teratogenesis)等远期效应。它们与其他效应一样,也是化学物与生物体交互作用的结果。由于多与低剂量长期接触有关,且后果严重,是近代毒理学研究的重点内容。事实上,危险度评价的发展首先起源于对致癌物的管理。

根据 WHO 发表的资料,人类癌症有 90%可与环境因素有关,其中主要是化学因素。世界各国对化学致癌的研究非常重视,已被确定的人类致癌物有 50 余种。对化学致癌机制的研究和致癌的危险度评定,为人类肿瘤的防治提供了新概念和新观点。

化学致畸的研究重视起始于 20 世纪 60 年代初"反应停"事件的惨痛教训。反应停是一种镇静安眠药,对人和实验动物的毒性很小,可缓解孕妇的呕吐症状,治疗剂量为 100 mg,当时认为是一种安全有效的镇静剂。然而,临床使用不久,就发现在孕期 3~8 周服用 200 mg 时,便可引起胎儿短肢畸形。虽然马上禁止用药,但已在德国、英国、美国、日本等造成上万名胎儿畸形的悲惨事件。这一事件促进化学物的致畸作用的研究,现已发展到研究化学物对整个生殖过程及子代发育的影响。

许多化学物能损伤生物体的遗传物质。由化学物损伤遗传物质所引起的可遗传的改变即为突变或诱发突变(induced mutation)。人类的原发流产、死产和遗传性疾病与 DNA 分子改变和染色体畸变有关。肿瘤的发生也与诱发突变有关,大多数诱变物具有致癌作用。遗传毒理学主要研究化学物诱发突变机制和后果以及诱变试验作为快速筛选致癌物的方法。最近,对远期危害关注的另外一个热点是内分泌干扰作用(endocrine disruption),内分泌干扰作用与许多健康问题有关联。

一般认为,管理毒理学研究的内容至少包括安全性评价、危险度评价、危险性管理、危险性

交流。安全性评价是基础,危险度评价是管理决策的依据,危险度管理与交流是社会对危险度的反应。

管理毒理学是毒理学的科学性(science of toxicology)、毒理学的艺术性(art of toxicology)与决策(decision-making)的完美结合与逐步提升。毒理学的科学性是观察和资料收集,毒理学的艺术性是危险度预测或评价。我们可以用毒理学科学提供的事实来对迄今还不知道或知之不多的化学物潜在毒作用作出假设或预测,如基于氯仿引起小鼠肝癌这一事实,推测该化学物对人可能也有类似作用。显而易见,预测或假设是否成立,不仅取决于毒理学科学获得的资料质量与全面性,还取决于观察到的情况与推测的情况两者之间关系。如不能区别科学与艺术,就可能混淆事实与假设。因为在管理毒理学范畴内,常需要有合理、科学的假设。

为了保证毒理学科学所提供资料科学、可靠又完整,人们提出了化学物的安全性评价(safety evaluation)或毒理学评价程序,从急性到慢性、从一般毒性到特殊毒性、从体内到体外、从低等动物到高级动物,颁布了一系列实验指南。简单说,安全性评价是通过动物实验和(或)人群观察,阐明某一化学物的毒性及其潜在危害(hazard)。所谓危害是指化学物引起有害作用的可能性,其概念较为含糊,不涉及剂量大小、反应的多少或效应的严重程度。相反的概念是安全性(safety),是指在一定接触条件下化学物不引起或只引起可被接受的轻微损害。它和危险度是从不同角度说明同一问题,即人群触接环境化学物的后果问题,是一种相对的安全概念。

化学物的危险度评定(risk assessment,也翻译为风险评估)是安全性评价的进一步发展,是一种定量评定,是毒理学科学与毒理学艺术的结合与发展,可预测化学物在接触人群中引起有害健康效应(即危险)的发生率。所谓危险度(risk)是指在特定条件下接触某种水平的化学物而产生健康损害的预期频率,是一种统计学概念,可用绝对危险度或相对危险度来表示。最初,美国环境保护署(EPA)将危险度评价应用于管理放射线接触的安全问题,继之应用于管理致癌物,目前已推广应用于一般化学毒物。危险度评定包括危害鉴定、剂量-反应关系评定、接触评定和危险度特征分析。它是对各种环境有害因素进行管理的主要依据,是管理毒理学的核心内容。

管理决策是毒理学的科学性与艺术性在社会的准确体现。在我们知晓外源化学物可能对健康的影响后,可以根据化学物与人类生活的密切关系,是否真的不可避免的需要,采取相应管理措施,这称为危险性管理(risk management)。例如,接触苯可以引起白血病,但我们不能完全停止使用苯,因为其在我们的生活中发挥着不可替代的作用,只能靠严格限制使用,最大限度减少接触来避免其危害。农药杀虫脒可以致癌,我们就可以完全禁止生产、销售、使用,因为我们有相应的农药代替其功能。一些药物,如化疗药物,绝大多数本身就是致癌剂,虽然有明确的不良作用,但临床仍在使用,因为我们需要其有效的治疗作用。反应停的再次临床使用也是一个例证。因此,发现化学物可能对健康有危害,不是简单的禁止,而是取其利,避其害。要避免不必要的接触。对容许接触的化学物,我们需要制定相应的卫生标准。工业化学物要有车间空气中有害物质的最高容许浓度限值,环境污染物要有环境介质中的最高容许浓度限值和每日容许摄入量,食品中某些化学物,如添加剂或农药残留物要有最高容许量、容许残留量和每日容许摄入量等,药物要有应用对象、应用剂量等种种限制说明等,以避免某些化学物对社会和人群健康造成危害。卫生标准的研制已经是毒理学,特别是卫生毒理学工作不容忽视的重要工作内容。

对一些在一定条件下引起健康损害的、但人们又不得不或不可避免接触的一类化学物，我们需要应用危险性交流的技巧，告知公众正确对待之。由于一系列不正确的信息传递，一些重要化学物的危险性被媒体“放大”，造成了人心恐慌的事件，使人们认识到仅专业人员知道化学物的毒性、危害和危险度还不够，我们需要与公众的危险性交流。危险性交流是管理毒理学中的一项内容，近年来由于对其重要性认识的发展，渐趋成为专项内容。

危险性交流（risk communication）是个体、群体以及机构之间交换信息和看法的相互过程。这一过程涉及多层面的可能危险和相关信息，除化学物本身的危险信息外，还包括公众对危险的关注、意见和相应机构的反应，以及国家或相关机构在危险性管理方面发布的法规和措施等。有效的危险性信息交流强调双向的作用过程，而不只是单向的危险性信息发布，要听取有关人员和公众的反馈、了解他们真正关心的问题，并能使其参与危险性管理政策的制定，才能在危险性信息交流的双方建立起真正的信任，对减轻和消除不良影响产生积极的效果。

与危险性交流相关的一个概念是危险性感知（risk perception），它是公众对实际危害或危险性的认知状态，通常受危险的特征影响使当事人会夸大或缩小对危险性的看法。如果接触这些危害因素是当事人不情愿的、自己无法控制的，且可由他人操纵的、不能公平对待，接触这些因素没有任何益处，且又无明确的来源，接触这些因素后危害是致命的、灾难性的或作用持久，往往引起对危险性感知的增加。相反，则可以引起危险性感知下降。危险性感知始终影响人们的行为，如吸烟的危害众人皆知，但仍有不少人烟雾缭绕。

由于危险性交流处于复杂的社会背景中，因此它总会面临一些困难。如何介绍化学物危险性的性质与概率大小，尤其是向具有不同文化知识和科学水平背景的社会公众用易于理解的方式准确地表述出来，有时非常困难。由于各种复杂因素影响到公众对危险信息的认知及心理状态，从而影响到信息交流的实际社会效果。这也是毒理学的艺术性所在，也是今后须加强多学科的联合研究的新领域。

第三节　毒理学研究方法

毒理学是一门综合性学科，须应用多方面的知识和方法进行研究。描述毒理学与机制毒理学研究是实验性科学，而管理毒理学涉及面更广，既要对实验数据进行归纳总结，又要有分析、推论、假设，更有社会科学、管理科学的渗透。因此，不能简单地说从事毒理学研究只要掌握实验技巧就够了，需要更多的知识，如实验设计、数据处理、生命科学基础知识等。

毒理学，特别是卫生毒理学的重要任务是预测化学物对人的危害，从这一点讲，人是最好的实验对象，与动物实验相比不存在任何种属差异，可以直接知晓对人的状况。事实上，不可能故意地把人作为实验对象，因此动物实验仍然是认识化学物毒性，特别是新化学物毒性的主要途径。从使用的实验对象来讲，毒理学实验从宏观到微观大概可分为 5 个层面，即人群研究、整体动物研究、离体器官和组织水平的研究、细胞水平研究和分子水平研究。无论什么研究，都要遵循合理的实验设计原则。

一、人群研究

人群研究可以包括对事故性中毒患者的系统观察、志愿者试验和流行病学调查。通过中毒事故中受害者的临床观察获得关于人体的毒理学资料，既有化学物中毒过程的进程变化资

料，也有临床处置资料，对中毒控制急救具有重要价值。这是临床毒理学主要工作内容。目前，中毒控制中心的在收集积累资料、指导临床治疗发挥着重要作用。志愿者试验在药物研发阶段是一个重要的步骤。要研究化学物对人的精神和心理方面的作用，也只有直接对人体进行观察才能了解。一般用于低浓度、短时间接触的实验，如测定化学物对眼和黏膜的刺激作用、人的嗅觉阈、对皮肤的刺激和致敏作用。人群流行病学调查主要用于研究低剂量长期接触的危害。人群观察数大，则可发现过敏体质和易感的个体。在人群研究中接触某一化学物的职业人群通常是最佳的研究对象，较一般人群相比，他们接触水平高，如果该化学物对健康有影响的话，他们应是首当其冲，容易发现其危害。大多数的人致癌物是依据职业流行病学调查资料确定的。由于人群长期接触的复杂性，在接触评估和效应评估和两者之间关系分析时，要注意其他混杂因素的干扰作用。随着分子流行病学研究的发展，观察指标的微观化，人群研究在毒理学中越来越受到重视。须提醒的是，无论何种人群作为对象，其研究过程必须符合伦理学要求。

二、动物实验

动物实验在毒理学的创立和发展中起了重要作用，传统的毒理学研究主要是动物实验。例如用受试化学物对小鼠或大鼠的致死量来估测它们对人体的毒性和急性中毒的表现，用亚慢性毒性试验测定化学物的蓄积毒性，用慢性毒性试验提供人在长期接触条件下的安全剂量或浓度，为制订接触限值提供依据。由于动物对化学物反应存在种属差异，所以常用几种实验动物，如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、犬和猴等进行针对性研究。另外，在研究有机磷酸酯引起迟发性神经毒作用时常选择鸡。在生态毒理学研究中，还要选用鱼类、鸟类、昆虫和其他野生动物进行实验或现场观察。虽然整体动物，尤其是哺乳类动物与人体在解剖、生理、生化、能量和物质代谢方面比较接近，用动物实验结果外推于人比较可靠，但是动物实验耗资大、花时多，难以满足日益增长的毒理学研究需求。

现今整体动物实验与人体观察相结合，仍然是毒理学研究的重要和必要的手段。问题在于应尽量减少动物的用量，综合利用实验动物，如采用慢性毒性试验与致癌试验相结合的设计方案。用一批动物连续进行，缩短实验周期，减少动物用量。目前，最常用的办法是在经典的动物实验设计上，开展更深入的研究，一次(批)给药可以同时观察多种指标。在动物实验时，落实 3R 原则是将来发展方向。3R 原则是 1959 年英国动物学家 William 和微生物学家 Rex 在《人性动物实验技术原则》一书中提出的。正确的科学实验设计应考虑到动物的权益，尽可能减少动物用量，优化完善实验程序或使用其他手段和材料替代动物实验的 3R 原则。3R 即减少(reduction)、优化(refinement)和替代(replacement)的简称。减少是在满足实验要求，又不损失应得信息的前提下，尽可能减少实验动物的数量。优化是在动物实验时，尽可能选择和改良实验操作技术，减轻动物可能遭受的痛苦，如采用非致死终点或浓缩样品减少灌胃次数。替代是不通过与动物相关的实验或过程去获取所需的知识，如采用体外细胞和组织培养替代整体动物实验。3R 原则作为系统理论提出后，在世界范围内得到了广大科研人员的认同，美国和欧洲将 3R 原则作为制定动物福利法规的基础。1995 年有关专家提议将 3R 中的“替代”提到首位，称为“替代方法的 3R 原则”。我们谈替代方法，不是唯一的替代的概念，而是囊括替代、减少、优化和试验组合的多重概念。

无论传统的动物实验方法，还是替代方法都可以一定程度描述毒性，只是外推的难易程度、社会可接受程度有区别而已。替代方法的应用领域虽相当广泛，但仍需谨慎扩大。对于关

系到人类健康和生命安全的实验，如人类疾病模型的实验，关键的药效学实验和新药安全评价中中药的毒理学实验等，实验动物仍是最客观、科学、参考意义最大的观察对象。

动物实验替代方法是在经典的动物实验基础上发展而来，但并不是每种动物实验方法都有相对应的替代方法。各个行业进行替代方法研究、推广的进展速度都不一样。从替代方法在国外的发展历史来看，欧盟的替代方法主要用于化妆品，因为化妆品人用量有限，其健康风险可以预期控制在有限范围。在药品、生物制品、化学品、农药等行业，替代方法的研究与推广步伐明显缓慢，原因之一是以上各种化学品与人体接触机会、频率都较化妆品多，且接触途径也更广泛、直接，随之带给人类的潜在风险也成倍增加，因此在对这些类别的化学品进行毒性评价时，仍倾向于采用与人体更为相似的整体实验动物进行研究，或者将动物实验作为最后的试验手段，以期待能得到每种化合物最为科学、客观的数据。

三、器官和组织水平

器官灌流(perfusion of organs)是毒理学研究的重要手段，是连接体外与体内实验的重要桥梁，常用的有心、肝、肾、肺、脑、小肠和皮瓣灌流。器官灌流模型中细胞的整体性、细胞间的空间关系仍维持原状，是细胞培养、亚细胞系统(组织匀浆、细胞器)所不具备的。分离的灌流器官可用于研究该器官与毒物的相互作用、化学物的代谢、毒物动力学或毒物的作用方式等。特定器官要使用特殊设计的器官灌流仪以及能维持器官存活状态的时间有限，是器官灌流应用有限的主要原因。

四、细胞水平的研究

细胞培养在毒理学研究中应用广泛，可用于研究外来化学物的毒性、可疑致癌物的筛检、解毒物的筛选，阐明化学物的生物转化和毒作用机制。细胞是生物体最基本的单元，各种生理、生化过程都由各种细胞和细胞群体完成。从动物或人的脏器初次分离的细胞称为原代细胞，一般尚保持原细胞的代谢活化和其他功能，在体外可以分裂增殖。随着细胞的传代，某些功能可能会消失，最终不再分裂增殖而死亡。建立的细胞受试系统可以研究化学物对细胞形态、结构和功能的作用，对它们可作定位、定性和定量研究。化学物和其他环境因素对不同细胞间和细胞内不同信号转导途径间的交互作用，其网络系统的结构和功能的作用，越来越受到重视。转基因细胞系统的建立为细胞水平的研究开辟了广阔前景。在基因组学和蛋白质组学研究获得巨大突破和丰硕成果时，科学界认识到基因的表达和蛋白质间的相互作用，最终应在细胞水平上进行整合功能的研究，因此，细胞组学(cytomics)正在形成和发展。细胞成活率、细胞接种效率及增殖、细胞生化、细胞染色体畸变、细胞突变、细胞转化等都是常用的实验。超速离心技术的发展，已能将不同的细胞器或组分进行分离。亚细胞水平的体外试验可用于化学物引起毒效应的亚细胞定位、生物转化及毒作用机制的研究。由细胞分离出不同的细胞器及其组分，如线粒体、细胞核、内质网、溶酶体、高尔基复合体、胞内体(endosome)、微体(microbody)、细胞骨架等，也直接用于毒理学实验。

五、分子水平的研究

研究外源化学物与乙酰胆碱小分子到核酸、蛋白质、多糖、受体、生物膜等生物大分子的相互作用，可以在试管中直接用DNA片段，观察化学物与它们的加合作用或交联作用，分析加合物的结构、受试化学物与DNA交联的部位。用制备的红细胞膜作为受试物对膜的一系列

物理性能的影响。这类试验也可以在整体动物染毒后，提取组织的DNA，分析DNA加合物、基因突变部位等。它们在深入揭示化学物作用机制方面有独特的作用，是带动毒理学发展的主流。基因组学、后基因组学、毒物基因组学、蛋白质组学和糖原组学的研究，都属于分子水平的研究。生物芯片，包括基因芯片、蛋白质芯片的应用，为分子水平的研究提供了高效能的手段。

毒理学研究方法还有其他分类。这些分类从另外一个角度反映了毒理学方法特征，其内容在上面叙述的5个层面都能发现。如体内实验(*in vivo* tests)和体外实验(*in vitro* tests)。前者是在一定时间内，采用不同接触途径，给予实验动物一定剂量的受试外来化学物，然后观察实验动物可能出现的有害生物效应。后者是多数选用哺乳动物的器官、组织、细胞进行脱离动物整体的试验。它们都属生物学实验范畴。毒理学研究涉及受试化学物及其代谢产物的定性和定量问题，需要应用分析化学的方法，对外来化学物的成分及其杂质进行鉴定，对空气、水、土壤、食品等环境介质中的化学物及其代谢产物进行检测，对受试对象的生物材料中的化学物分析及代谢产物的分离到定性、定量鉴定，这是毒理学中研究剂量的不可或缺的环节。

总之，由于分析化学、生物学、分子生物学和遗传学的发展，以及放射性核素技术的应用，使近代毒理学研究内容得到飞速而深入的进展，研究内容已由描述性为主进入机制的探讨，在概念和方法上已发展成为较系统而全面。脏器灌流、细胞培养和细胞器分离制备等体外试验方法在毒理学研究中已普遍采用，并部分取代传统的整体动物试验，使化学物毒效应机制的研究可在整体水平、器官水平、细胞水平和亚细胞水平，层次分明地深入进行。生物化学和分子生物学的概念和方法，例如，酶、核酸和蛋白质的概念和方法，受体和离子通道的概念和方法，基因技术和单克隆抗体技术已成为毒理学研究的重要工具，使毒理学中有关机制的探讨进入分子水平，并逐渐向生命本质问题靠拢。

以往，毒理学的基本实验方法多数采用“高剂量模型”，而近年发生了变化。有可能普遍应用人体细胞或组织培养的研究模型，使毒理学研究更科学地指示化学物对人体健康损害的因果关系，也有可能使毒理学评价从“高剂量向低剂量推导”变成“低剂量原则”，毒理学实验不是看高剂量引起的致死等严重效应，而是观察化学物在比较接近常态下的生物学过程，阐明化学物造成健康损害的生物学机制。

生命科学发展带动了毒理学的发展。毒理学发展的历史证明，引进新的概念、新的理论、新的方法和技术，会导致新的边缘学科的形成，分子毒理学的形成是一个明显的见证。在毒理学研究中只要主动引进一种新的方法或技术，就有可能开创一个新的领域，获得创新的和领先的科研成果。

第四节　毒理学历史与发展

毒理学是在人类为了自身生存、自身满足、自身保护过程中逐渐发展起来的。回顾毒理学的发展历史，可以清楚地看到，它的发展绝不是孤立的，而是与各个时代生产和科学的发展、经济政治状况和防病治病的需要紧密联系的。

一、毒理学早期发展

毒理学的萌芽可追溯至中国古代的“神农尝百草”时代，此后中药典籍不乏记录有毒的植

物和矿物。在与自然斗争中,人们逐渐认识了有毒的植物、动物和自然界存在的一些有毒矿物和气体,积累了有毒蛇虫咬伤的治疗,催吐法治疗误食有毒植物引起的中毒等治疗方法。隋代的《诸病源候论》中就有毒物中毒概念和鉴别毒物的方法。宋代著名法医学家宋慈著《洗冤录》中也有关于物质毒性的记载。我国李时珍编制的《本草纲目》中描述植物、动物和矿物用作药物和毒物的资料尤为详尽,流传至今还有重要参考价值。在《本草纲目》还注意到工业毒物和职业中毒,指出"铅生山穴间……毒气毒人,久留多致病而死"。埃及、希腊、罗马和阿拉伯在公元前都有文字记载有关毒物的知识,如古希腊名医希波克拉底(Hippocrates)在他的医学著作中介绍了不少毒物。至12世纪末Maimonides(1135～1204)发表了世界上第一本有关毒物的专著《毒物及其解毒药》。在中世纪,毒物成了谈虎色变的东西,因为其往往被用作政治活动中的谋杀工具。在莎士比亚的悲剧《罗密欧与朱丽叶》中详细记录了朱丽叶假装自杀等待罗密欧救助的场景"Come bitter pilot, now at once run on; The dashing rocks thy seasick weary bark! Here's to my love! O true apothecary! Thy drugs are quick. Thus with a kiss I die."真实反映了当时对毒物的效应、剂量的认识,可谓充满了科学性。

欧洲文艺复兴时期的Paracelsus(1493～1541年)为现代毒理学的发展打下了基础,他提出的必须通过实验才能了解机体对化学物的反应,知道了剂量-反应关系,用正确的剂量区分毒物与药物,可视为发展毒理学科的里程碑。他的名言"What is there that is not poison? All things are poison and nothing without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison."成了毒理学的金科玉律。

19世纪的工业革命使社会生产大力发展和工人队伍扩大,但此时恶劣的生产环境造成工人中毒种类和频率激增,引起社会舆论的不满。这一现象既为毒理学家(当时多为临床医生)提供了研究疾病与环境接触的素材,又促使他们进行了大量的科学实验研究,使毒物化学、中毒治疗、毒物分析、毒性、毒作用模式以及解毒药等得到一定的发展。毒理学作为一门独立的学科是西班牙人Orfila(1787～1853年)创始的。他于1816年提出建立毒理学科的设想,并采用动物实验系统观察化学物与生物体间的关系,提出了一些测试毒物的方法,为创建毒理学学科作出了巨大的贡献。随后的一百多年中,毒理学研究都是作为药理学的一部分。因此也可以说,毒理学最先是从药理学发展分化而来的。毒理学与药理学有相同的理论基础和研究方法,主要差别在于,药理学着重研究药物对生物体的有益作用,寻找药物防治疾病的有效剂量;而毒理学则侧重研究化学物对生物体的有害作用和防止发生健康损害的安全剂量。在Paracelsus和Orfila两人的思想倡导下,毒理学也按照当时科学发展的道路,逐步摆脱了仅凭直观和经验认识事物的模式,开始采用实验的、分析对比的、逻辑推理的思维方式进行研究和观察事物的本质,从而掌握其规律性。德国科学家在19世纪和20世纪初对毒理学发展的贡献功不可没,当时的德国毒理学教育为后期的药理学、毒理学发展起到巨大的推动作用。

二、毒理学近期发展

19世纪末,有机化学物开始广泛应用,苯、甲苯、二甲苯大量生产,随之中毒现象时有发生。此时,美国的一些主要的化学物生产企业开始建立毒理学研究实验室,为解决工人健康和产品的安全性问题提供依据。20世纪初期,法国科学家居里等发现放射性,为物理学、生物学和医学开辟了新的研究领域。抗生素的发现导致开始应用大规模的生物试验,测试它们对动物的有益和有害作用。

20世纪20年代发生的一些事件促使毒理学开创了一些新的研究领域。当时砷化物用于

治疗梅毒造成了患者的急性和慢性中毒。三邻甲苯膦酸酯、甲醇和铅首批确定为神经毒物，对它们的毒性研究可作为神经毒理学发展的初级阶段。滴滴涕和其他氯代烃类化合物如六氯苯、六氯环己烷作为广泛应用的杀虫剂也成了毒理学的研究对象。同时有科学家开始从事雌激素和雄激素结构与活性关系的研究，结果导致合成活性更大的己烯雌酚。20 世纪 30 年代，德国和美国制药工业开始生产抗生素。1930 年欧洲第一本实验毒理学杂志"*Archiv Für Toxicologie*"创刊。同年美国卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)成立。磺胺类药物制剂中的乙二醇(作为溶剂来改善溶解性)的代谢产物草酸、羧基乙酸和磺胺药在肾小管形成结晶引起肾衰竭的悲剧，促使了美国政府成立了现在家喻户晓的食品和药品管理局(FDA)，从事食品和药品的登记管理工作。

20 世纪 40 年代开始，科学技术发展的一大特点是化学合成和相关工业的飞跃，出现了众多的高分子聚合物(塑料、合成纤维和合成橡胶)和日新月异的合成农药、各种形式和用途的化学产品相继问世。这些产业发展，使得接触化学毒物的工人数猛增，职业中毒事故不断发生，解决问题的需求促进了工业毒理学的发展。在此期间，化学致癌研究更加深入，动物实验证实了几个世纪以前临床医生提出的阴囊癌和膀胱癌的化学病因，其重要成果是逐渐形成关于肿瘤的诱发因素多数为化学物的概念，并引进了相应管理措施。

20 世纪 50 年代人类社会经历了所谓原子时代、电子时代等，于是毒理学的研究对象已经不限于化学物。对于核素、微波、磁场等物理因素，甚至对某些生物因素和粉尘(矿尘、石棉、木尘)等也开展了毒理学研究。期间，人工合成化学物和农药严重污染环境造成的环境公害病，如日本的水俣病和痛痛病相继发生。环境致癌物不断被证实，并发现某些化学物可引起遗传物质的变异。

20 世纪 60 年代初短肢畸形在多个国家暴发，很快由临床流行病学调查认定病因为服用药物反应停造成，后来又为动物实验所证实，从而促进了畸胎学和发育毒理学的发展，并迅速在一些国家的卫生法规中得到反映，要求药物、农药和食品添加剂必须通过有关毒理学试验才能投入市场。1962 年，美国科普作家出版了《寂静的春天》，唤起了人们对农药环境污染严重性的关注。70 年代期间，美国有害废物、化学垃圾堆放场地等危害问题的暴露，引起各国政府对环境污染和环境保护问题的重视。化学物的致畸、致突变和致癌性的研究，促使遗传毒理学的异军突起。为了加强化学物的管理，各国政府制定了一系列法律，如美国的《有毒物质控制法》、《污染治理法》。主要为立法提供依据的毒理学的新的分支管理毒理学应运而生，化学物的危险性评价有了发展。90 年代起，在经济发达国家，在环境治理获得较好效果的情况下，进一步提出了环境内分泌干扰物包括环境雌激素、环境与致癌、环境与衰老等更深层次的环境污染问题，这已成为当前毒理学研究的重要课题。

20 世纪初毒理学主要是依附在药理、法医学、职业医学和内科学的范畴内，与这些学科同步取得进展。在应付上述挑战的过程中，毒理学自然而然地脱离其附属地位，独立地发展起来。自 1950 年以后，毒理学日渐成熟形成一门独立的学科，并在近二三十年内迅速发展成为分支众多、相互交错的一个学科群。过去半个世纪中，毒理学领域内硕果累累，经济效益和社会效益显著。可以说，毒理学的发展为社会认识化学物危害、控制化学物危害起到了功不可没的作用。这些问题的解决又推动了毒理学的发展，使毒理学被政府、社会所承认，专业队伍不断扩大。在美国，毒理学学会(Society of Toxicology, SOT)已经成为举足轻重的专业团体，每年的 SOT 年会吸引了除美国以外许多国家的专业人士参加。国际上也有 International Union of Toxicology (IUTOX)，但社会影响力似乎不及 SOT。毒理学也有了经典教材，

Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 教材自1975年问世以来已经出了8版。一般认为该书是介绍毒理学基本概念和理论的权威，对引导毒理学教学起重要的作用。

三、中国毒理学的发展

我国近代毒理学的研究始于20世纪20～30年代，法医工作者开始用病理学和分析化学方法进行毒物鉴定。毒理学领域对氰化物中毒解毒剂的研究，推动了毒理学的进步。然而，我国的毒理学直到新中国成立后才得到真正的发展。新中国成立初期，防治化学中毒成为劳动卫生的首要任务，化学品毒性测试和毒性分级的研究十分迫切。50年代在前苏联专家的帮助指导下，人才的培养和急性毒性的识别与解毒取得了显著进步，在中国预防医学科学院劳动卫生研究所建立了毒理研究室，部分医学院卫生系相继开展了工业毒理、环境毒理和食品毒理的研究工作。

60年代已逐渐形成了一支毒理学专业队伍。研究工作从铅、苯、汞等重金属、有机磷农药、有机锡农药扩大到丙烯腈、乙腈、氯乙烯、氯丙烯、有机氟类、硼氢及肼类化合物等石油化工、高分子化合物等多种工业毒物的毒理和解毒治疗、卫生标准研制，为急性中毒控制提供了重要依据。同时在环境污染物和食品中有毒物质的毒性研究也有了长足进步。使毒理学成为我国预防医学的重要组成部分。在毒理学研究方法上，快速毒性测试、蓄积毒性测试、急性阈浓度测试等方法都已积累了一定的经验；动式吸入装置的研究、农药经皮肤吸收的研究随后建立了体外经皮吸收速度的模型，为毒理学研究奠定了实验基础。70年代后期出版的《工业毒理学》、《工业毒理学实验方法》等一系列书籍是对这一段时间的毒理学工作总结。值得指出的是《工业毒理学》填补了我国缺少化学物毒性实用工具书的空白，此书在1991年再版改名为《化学物毒性全书》。

在恢复高考后的第2年(1978年)原上海第一医学院卫生系就招收了第一届卫生毒理专业本科生。80年代，我国毒理学发展进入新时期。1981年卫生部决定在预防医学专业教学计划内正式开设毒理学课程，为培养和扩大毒理专业人才，发展我国的毒理学事业作出更大的贡献。目前我国不仅医科、药科、中医药大学为本科生、研究生提供毒理学教程，其他如工业、农业、林业、交通、海洋、水产、理工、科技、师范等领域的高校也提供毒理学教程或内容相近名称不同的教程。

1981年在《中国医学百科全书》中首次编纂了毒理学分册，将工业毒理、食品毒理和环境毒理统一在一个大概念毒理学之下，并系统介绍了毒理学的一些基本概念。1985年我国成立全国性毒理学术组织，标志着我国毒理学工作队伍的成长壮大和学术水平的发展。中华预防医学会卫生毒理学专业委员会于1987年创刊了《卫生毒理学杂志》(现名《毒理学杂志》)。《毒理学进展》、《卫生毒理学基础》等一系列专著出版。此时期，我国颁布了农药、化妆品毒性测试、食品毒理规范等法规，加强了化学品的安全管理。开展了致癌、致畸、致突变研究，建立了一系列快速筛检试验方法，出版了《环境化学物致突变、致畸、致癌实验方法》、《遗传毒理学原理》等专著。1993年，中国毒理学会成立是我国毒理学发展的一个里程碑，学会成立了20多个专业委员会，学会期刊《中国药理学与毒理学》越办越好。

总体来讲，我国毒理学研究与国际水平差距已经越来越小，一些先进的研究手段也不断引入毒理学研究领域。像转基因细胞株和数种质粒载体转基因动物等的建立、生物芯片的试制成功，毒物作用下突变基因的分离、测序取得的初步成果，都反映了我国毒理学某些领域的研

究已达到国际先进水平。但与发达国家相比，科研投入仍显不足，毒理学的方法原创尚不多。在管理毒理学领域，安全性评价方法的完善，将毒理学的科学性与艺术性的很好结合都需要加强。

四、毒理学发展趋势

毒理学是一门应用性科学，与人们的日常生活、环境保护、经济的持续发展和人们的健康密切相关，因此必将得到更迅速的发展。毒理学总体发展而言，是从表浅到深入、从简单到复杂、从宏观到微观为主要趋势。今后势必将在微观深入的同时，重新审视宏观和基础的问题，使毒理学概念不断更新、丰富、完善和提高。

毒理学揭示外源化学物对人类和环境生态的潜在危害，从而在预防和控制这类危害中起着重要作用。对化学物和健康相关产品的毒性鉴定或它们的健康安全评价，仍将是毒理学的重要工作内容。利用定量构效关系研究和建立化学物毒性预测系统已成为当今毒理学研究的内容。体外测试系统在揭示生命的奥秘和毒物作用机制方面起了重要作用，在化学物的毒作用研究方面也必将更广泛地应用体外试验系统。完善致畸物、致突变物、致癌物和内分泌干扰物的筛检系统，筛选出需要优先进一步研究的化学物，建立合适的组合试验，判定预测可能具有这类危害的化学物，为禁止生产和使用、加强管理提供依据。

现代毒理学吸取各门生命科学技术的养料得到发展的一个特点，是使其本身从原来以整体动物研究为独特的手段中，逐步开拓在器官水平、细胞水平、亚细胞水平方面进行研究。由于 DNA 分子结构在原核生物、真核生物直到哺乳动物和人之间的高度统一和相似，因此，分子水平的深入研究有可能不仅仅在化学诱变和化学致癌两方面有广阔的前景，而且为物种感受性差异、体内外试验差异方面问题的解决打开了缺口。所以，向微观方面深入研究有可能补充、修正和影响未来的宏观决策。美国国家科学院在 2007 年发表的《21 世纪毒性测试——愿景与策略》很好地诠释了毒理学试验发展的重点方向，从整体动物到人类细胞、细胞系或细胞成分，试验成本越来越少，借助于大数据、信息化的处理归纳，疑惑的解释越来越全面。

随功能基因组时代的到来，生命科学中出现了蛋白质组学（proteomics）、代谢组学（metabonomics）和细胞组学（cytomics）等新兴学科。它们以生物体内全部基因或蛋白质为对象进行整体性研究，关注的对象已不再停留于一条代谢途径或信号转导通路，而是提升到了细胞活动的网络和生物大分子之间复杂的相互作用关系。这一生命科学的发展趋势，必将带动现代毒理学的发展。基于外源化学物的大多数毒理学相关效应都可直接或间接影响基因表达这样一个事实，通过基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学、相互作用组学到表型组学技术在不同水平揭示由基因组序列和调控的改变到毒性表现的过程和机制，利用生物信息学和计算毒理学进行数据分析、开采和挖掘，可以对外源化学物的损伤机制进行深入研究，从而建立新型的危险度评价模型和损伤预测模型是未来的发展趋势。

生物体是一个复杂系统，只有通过把孤立在基因、蛋白质等不同水平上观察到的各种相互作用、各种代谢途径、调控通路的改变整合起来才能全面、系统地阐明复杂的毒性效应。因此，毒理学一个必然发展趋势就是向系统毒理学转变。目前认为，所谓系统毒理学是指通过了解机体暴露后在不同剂量、不同时点的基因表达谱（基因组学）、蛋白质谱（蛋白组学）和代谢物谱（代谢组学）的改变以及传统毒理学的研究参数，借助生物信息学和计算毒理学技术对其进行整合，从而系统地研究外源化学物和环境应激等与机体的相互作用的一门科学。系统毒理学在阐明毒物对机体损伤分子机制、分子生物标志和危险度评价等方面有望取得突破。可以肯

定系统毒理学虽刚起步，有许多不足，但其发展和应用将会对人类的环境与健康研究产生极大的推动作用。

毒物的暴露往往会直接或间接地引起基因表达的改变，实际上毒性就是毒物对细胞正常功能或结构的干扰。除了迅速坏死外，大多数病理过程是在基因调控下进行的，特定基因表达的差异是与毒理学后果密切相关的。与毒性相关的基因表达的变化往往比目前应用的病理学终点出现更早。毒物所诱导基因表型的变化往往不是单一基因功能改变的结果，而是众多基因表达网络、多个细胞生物效应的综合结果。系统毒理学可利用多种高通量检测技术同时从多个水平对暴露后的生理、生化等自稳态进行监测，涵盖整个损伤发生的几乎所有的环节，结合传统病理学终点，从而对于毒物作用分子机制可进行深入的了解。

系统毒理学研究发现的差异表达基因、蛋白质和代谢物群是暴露标志物、效应标志物和易感性标志物的候选对象。再利用特定的靶向技术，如实时定量 PCR、抗体分析技术和质谱色谱等，可以很快地确定并发现新的生物标志。利用这些生物标志能够实现在安全剂量下进行人体作用机制的研究。相近作用机制的化学物可诱导产生相似的基因和蛋白质表达谱，不同的基因表达模式可区别不同机制的化学物，从而得到具有“诊断性”的基因和蛋白质表达谱，并与已知标准参照物的表达谱比较。这类全面检测机体所有表达基因的技术将可以用于预测未知毒物的毒性作用，从而对毒物毒性实施预测。

系统毒理学的各种技术具有较高的灵敏度和检测通量，可以在动物实验的低剂量、早期阶段对损伤效应进行深入全面的了解，一方面可以大大减少实验动物的数量，另一方面又减少了实验动物的痛苦。如果体外细胞实验提示毒物效应轻微，体外动物实验甚至有望避免。高通量的组学手段为研究混合化学物暴露后化学物之间的协同作用或拮抗作用提供了一种全新的方法。通过比较某一混合物与已知的化学物的基因表达模式就可以判定其中的微量污染，这在混合物的毒性和作用机制研究中具有重要意义。系统毒理学可以方便地进行交叉设计、均匀设计等研究，从而可以方便地研究混合组分的交互作用。

推断毒物低剂量作用于人体时的效应是安全性评估的核心。系统毒理学可有助于解决动物实验结果外推到人类不肯定性这一难题。虽然人和某些实验动物在化学物吸收、代谢作用和排泄方面具有一定程度的相似性，但是实验动物和人毕竟具有本质上的差异，这就有可能因为实验动物对某一化学物具有更大的耐受性或缺乏相关的毒物作用靶点而掩盖了化学物毒性结果的出现。如果在人体内基因、蛋白质、代谢物变化模式与实验动物模型不同，可以认为两者在某些方面缺乏相关的毒性机制环节，不适宜利用这种实验动物进行相关化学物的安全性评价。相反，如果变化模式相似程度越高，就越易于根据标志性基因、蛋白质、代谢物的变化进行毒性反应的外推。我们可以通过对梯度剂量下细胞内相关分子变化的检测，对比动物模型或细胞模型与人之间反应的异同，尤其是关键基因表达的相似程度，来选择合适的模型进行安全性评价。

传统毒理学为了减少漏筛毒物毒性的机会，总是采用过大的剂量，并用各种方法外推至低剂量时的效应。由于种属之间的差异，往往会造成某一种属动物具有比人类更强的剂量耐受性。系统毒理学可利用高通量检测技术在很宽的剂量范围内对上万个基因表达、蛋白质或代谢过程的改变进行检测。化合物可在低于引起病理变化的剂量时引起基因、蛋白质表达变化。通过测定低剂量下基因、蛋白质和代谢物的变化，就可能为高剂量向低剂量效应的外推及确定产生毒性的阈值剂量提供重要依据。由于低剂量毒物作用下许多基因的表达是可逆性的，甚至是与毒性结果的产生无关的，有必要进一步深入研究，把这些与毒性评价无直接关系的基因

表达从其中去除。应用组学技术分析低剂量毒性的同时还能发现参与这一过程的其他反应通路，使人们对于外源化学物作用后的细胞调控机制有一个更全面的了解，从而推断毒物在不同剂量下可能的毒性。基于低剂量暴露时的分子损伤机制研究结果，来自于系统毒理学的用于毒物危险度评价的剂量-反应关系将具有更高的可信度。

第五节　毒理学在预防医学中的应用

毒理学在预防医学领域内的实际应用和发展，形成了毒理学的重要分支——卫生毒理学。卫生毒理学主要包括环境毒理学、工业毒理学（或职业毒理学）、食品毒理学 3 个方面。卫生毒理学是毒理学在解决环境卫生、职业卫生和食品卫生问题中发展起来的。

毒理学在预防医学领域里，主要研究对象为工业化学物、农用化学物、环境污染物、食品及生活日用品中有害成分，它为职业卫生、环境卫生、食品卫生等学科提供毒理学的基础理论和研究方法，是预防医学专业的基础学科。工业化学物是在生产环境中可与人体接触，接触途径以呼吸道和皮肤为主，接触剂量相对较高，接触时间相对较短，接触工人主要为健康的成年人，较少涉及老、幼、病、弱易感人群。环境污染物可经消化道、呼吸道和皮肤吸收，人体接触的时间一般较长，可反复多次接触持续终生，但接触剂量相对较低，接触人群包括健康者及老、幼、病、弱，易感性差异极大。食品中的有害成分主要经胃肠道吸收，接触剂量较低，接触时间较长，接触人群较广泛。因此，毒理学由于研究对象不同，在研究方法和内容上有一定差别。

一、卫生毒理学基本特征

卫生毒理学是按照毒理学的工作任务而划分的一种名称，与人类日常生活和生产劳动关系日益密切，如环境污染、食品的安全性、兽药及农药的危害，以及作业环境的有毒物质都是世界范围内的严重问题。在卫生毒理学领域内，环境毒理学、工业毒理学和食品毒理学研究的对象和内容各有所侧重。

环境毒理学是研究环境污染物对人体健康的影响及其机制的学科，是环境医学的一个组成部分。环境污染物对机体的作用一般具接触剂量较小，长时间内反复接触甚至终身接触，多种环境污染物同时作用于机体，接触途径可以是呼吸道、消化道或皮肤，接触的人群既有青少年和成年人，又有老幼病弱，易感性差异极大等特点。因此，在开展环境毒理学研究时，需考虑多重途径接触、长期终身接触、接触剂量低和混合接触、接触人群易感性差异大的特点。

一般认为，环境毒理学的基本任务应包括下列 3 个方面：①研究环境污染物及其在环境中的降解和转化产物对机体造成的损害和作用机制；②探索环境污染物对人体健康损害的早期观察指标，即用最灵敏的检测手段，找出环境污染物作用于机体后最初出现的生物学变化，以便及早发现并设法排除；③定量评定有毒环境污染物对机体的影响，确定其剂量与效应或剂量-反应关系，为制定环境卫生标准提供依据。

工业毒理学是研究工业毒物在生产和使用过程中对人体健康的影响及其机制的学科。工人毒物接触的特征明显不同于环境污染物，接触途径一般是以呼吸道和皮肤为主、接触剂量相对较高但时间相对较短、接触化学物较为单纯、接触人群主要以健康状况较好的职业人群为主，人们可以通过职业选择或局部干预主动避免接触。因此，开展工业毒理学研究时，可能会考虑剂量相对较高、时间相对较短等特点。在考虑卫生标准的保护水平时，可以只考虑保护大

多数接触者，对少数易感人群可通过调离接触而得到保护。

食品毒理学是研究食品中污染物、添加剂或加工过程中产生的危害物等对人群健康影响及机制的学科。其接触人群是广泛的、接触时间是终身的，接触途径主要是消化道。由于食品的特殊性，人们关注人类食品中营养素过量或过少对健康的影响，甚至与其他污染物共存时对健康的危害。近10年来，保健食品的飞速发展和转基因食品的卫生安全评价，对食品毒理学提出了新的课题。

由于以上特征上的差异，在相应的管理以及毒理学实验设计上也有不同。事实上，这些研究的对象是可以完全一样的。以农药为例，在工业毒理学范畴内，可能会涉及在生产、使用过程中对职业接触人群的危害；农药一旦进入水体、土壤，整个人群就有了接触机会，研究环境中农药对人群的影响及相应管理，则属环境毒理学范畴；如果农药污染蔬菜、水果等粮食，造成食品农药残留，研究这些残留对健康的影响以及制定农药残留限制，是食品毒理学的任务之一。可以这样说，卫生毒理学领域内的各个分支的研究手段基本是共同的，最重要的区别是在于危险度管理时，考虑接触者不同亚群的自身特征不同而已。

二、卫生毒理学发展

目前，卫生毒理学“二极”分化现象非常突出。宏观上，管理毒理学研究大大加强，为化学毒物的管理提供科学依据；微观上研究更加深入，研究水平越来越精细，从细胞、分子到基因水平研究面临许多问题。上述两方面既分化，又相互渗透和结合，使卫生毒理学的科学性与应用性更为突出。

过去卫生毒理学研究主要以整体动物试验和人体观察相结合，这在相当一段时期内仍然是重要和必要的手段。随着分子生物学的理论和方法应用于毒理学的研究，将使外源化学物的毒性评价发展到体外细胞、分子水平的毒性测试与人体志愿者试验相结合的新模式，而传统以动物为基础的毒理学研究将减少。某些复杂的整体实验将逐步为体外试验或构效关系数学模式所代替。目前用于有害因素的毒性试验系统将被基因工程的动物和细胞所代替；传统的发病率和死亡率终点将被生化、生理指标或其他的生物标志所替代；现在需要数月给药和评价的毒性研究将在较短的时间内完成。预期建立的转基因动物对外源化学物的毒性反应将与人体极为一致，现行毒性试验的解释和外推方式将改变。

大量新技术和新方法在卫生毒理学领域应用，推动了卫生毒理学发展，分子生物学技术和方法已经广泛地应用于卫生毒理学领域，如体外采用细胞培养等检测遗传毒性，整体动物试验采用转基因动物模型，这对于揭示外源化学物的毒性及其机制均有重要意义。转基因动物是在其基因组中含有外来遗传物质的动物。由于转基因动物集整体、细胞和分子水平于一体，更能体现生命整体研究的效果，因此成为卫生毒理学研究的热点之一。例如，*C-fos-LacZ* 转基因小鼠用于神经毒性的研究；金属硫蛋白（*MT*）基因的转基因和基因删除小鼠用于金属和某些非金属的毒理研究。如用 *MT* 转基因小鼠对镉等的抗性增加，而 *MT* 的基因删除小鼠对镉、银、汞、顺铂和四氯化碳的毒性敏感性增强。转基因动物也用于生殖毒性研究，如 *ZP3*（编码）透明带硫酸糖蛋白基因删除小鼠、雌激素受体基因或孕酮受体基因删除小鼠、DNA 甲基转移酶基因删除小鼠等。

在卫生毒理学的研究中，重要的问题是如何把从动物所获得的资料用于人，把体外资料用于体内，把复杂的整体系统化为简单的并能人为控制的系统，以及如何提高检测的敏感性等。转基因技术为解决这些问题提供了崭新的手段。在代谢途径上，通过基因转移能人为控制某

一化学物的代谢；在整体水平上，可以人为控制某一基因的表达水平，从而揭示该基因在化学物致毒过程中的作用。可以预言，各种不同的转基因动物或基因剔除动物的建立，将对阐明化学物的毒性作用机制起到重大的作用。

当然，将这些先进的研究方法规定为安全性评价过程规范的实验，尚待时日，需要进一步的验证确定其阳性结果的意义以及与传统实验间的关系。要强调的是，虽然近年来细胞、分子水平的研究取得了很大的进展，但仅从基因分子水平研究外源化学物的毒性及其机制是不够的，因为机体还有宏观的“调控”一面，必须把微观研究与宏观研究紧密结合起来，把“组学”研究与传统指标研究结合起来，也就是将整体试验与体外细胞、分子水平的研究结合起来才能真正理解化学物的作用及其机制。

在认识、评价接触化学物对人类健康的影响时，科学家及政府决策者会面临一个重要的问题，即这些化学物是否已经有足够的毒理学信息。毒理学试验要消耗大量动物，而尽量减少动物用量是每一个毒理学家应该考虑的问题。显然，如果想对如此众多的外源化学物都作出毒性鉴定，就应该建立新的、可供选择的、耗费动物少、试验周期较短、花费较少的毒理学研究方法。建立这些方法应该基于动物用量减少、试验周期缩短、染毒浓度接近在环境中的实际浓度、利用统计或数学模型、预先进行有效的实验设计、发展管理毒理学等衡量标准，还应当鼓励将不同实验有机地结合起来进行。

卫生毒理学和分子流行病学结合，在危险度评价中发挥了重要作用。经典方法对安全系数要作许多修正，以提高品系、种属间推导预测的精确性，其结果就是提出一连串的假定的修正系数。近年来已提出新的方法，以尽可能使用实际数据而不是人为的假设来确定安全系数。例如，对致癌物质的评定将使用一种定量的模型，强调的是从高剂量到低剂量的推导，而不是从动物到人的种属间的推导。目前最常见的是线性多级 LMS 模型，它是将最大耐受量(MTD)的可信限上端延伸到原点，利用该直线的低剂量区域来估计外源化学物的量效关系曲线或其毒性强度。这种模型使用一个对应于小生物学单位——分子的剂量值，而不是将零作为剂量轴的原点。此外，毒性等效性因子或问答式的方法，构效关系的定量分析，以及毒效和毒物代谢动力学模型等，在化学物安全性评价的过程中也得到应用。

（周志俊）

第二章 毒物在体内的过程

第一节 毒物的吸收、分布和排泄

化学物的毒性依赖于其在作用部位的剂量,而剂量与化学物在反应部位的浓度常常是成正比的,但相同剂量的两种或多种化学物质的毒性则可能在某一个特定靶器官上产生不同的浓度,这主要是因为机体对这些化学物质的处置不同。机体对化学毒物的处置过程可简单地分成相互有关的吸收、分布、代谢及排泄 4 个过程(图 2 - 1)。外源性化学物质经由机体接触部位进入体循环的过程称为吸收;由体循环分散到全身组织细胞中称为分布;在组织细胞内经酶类催化发生化学结构与性质变化的过程称为生物转化(biotransfornation)或代谢转化,在代谢过程中可能形成的新的衍生物及其分解产物即为代谢物,外源性化学物质及其代谢物离开机体的过程称为排泄。化学毒物在体内的吸收、分布和排泄过程基本上是跨越生物膜的物理学或生物物理学过程,故统称为生物转运(biotransprotation),化学毒物在体内由酶催化的化学过程或生物化学过程称为生物转化或代谢转化(图 2 - 1)。化学物通过各种途径和方式被机体吸收后,经血液运输分布到全身各组织器官,它们或被储存在体内或在组织细胞内发生化学结构和性质变化转变为代谢产物,最终化学物本身及其代谢产物可通过各种途径排出体外。应该指出,吸收、分布、代谢和排泄的过程可能同时发生。化学物对机体的毒性作用,一般取决于两个因素:①化学物的固有毒性和接触量;②化学物或其活性代谢产物在靶器官内的浓度及持续时间,而后者与化学毒物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程有关。因此,掌握这些过程的基本知识对于研究外源性化学物质的毒作用规律和评价化学物质的毒性具有重要意义。

化学毒物在体内的吸收、分布、代谢和排泄是一个极其复杂的生物学过程,均需要通过多种屏障和多层细胞膜才能实现。所以,在学习毒物的生物转化之前应先了解生物膜的基本构成和化学毒物通过细胞膜的方式。

一、外源化学物与生物膜

生物膜(biomembrane)是细胞膜(cell membrane,也称质膜)和各种细胞器膜的总称,是外源化学物质在机体的吸收、分布、代谢与排泄过程中需要通过的屏障。生物膜除可将细胞或细胞器与周围环境隔离,保持细胞或细胞器内部理化性质的稳定外,还可以选择性地允许或拒绝

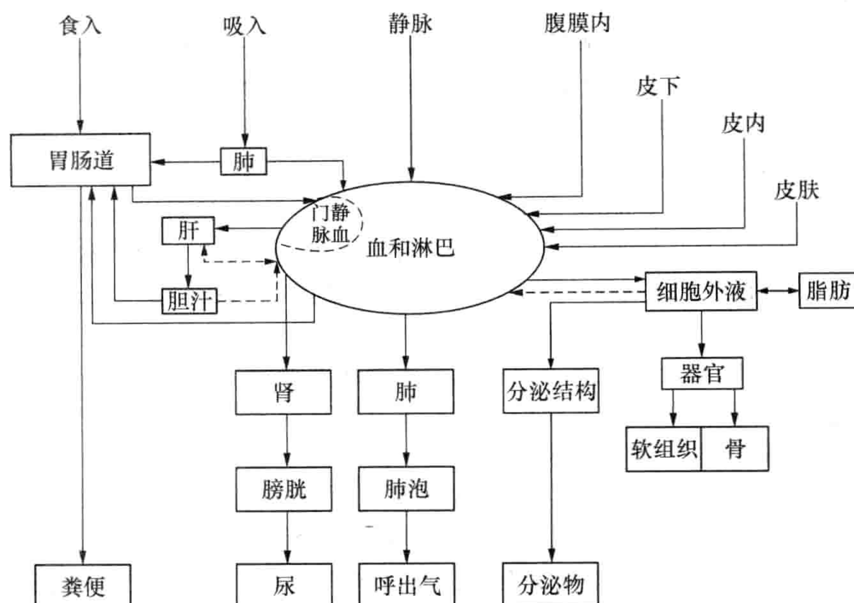


图 2-1 外源化学物在体内吸收、分布、代谢和排泄的路径

（引自裴秋玲.现代毒理学基础.中国协和医科大学出版社，2008）

某些物质向内或向外透过。生物膜是一种可塑的、具有流动性的、脂质与蛋白质镶嵌的双层结构。生物膜在结构上有 3 个特点与外源化学物转运密切相关。

1. 膜的脂质成分　生物膜双层结构的主要成分为各种脂质（磷脂、糖脂、胆固醇），其溶点低于正常体温，在正常情况下维持生物膜为可流动的液体状态。这种脂质成分对于水溶性化学物具有屏障作用，而对脂溶性物质则便于溶解和穿透。

2. 镶嵌在脂质中的蛋白质成分　脂质膜两侧表面可见镶嵌着多种蛋白质，其中有些贯穿整个脂质双层，可以起到载体和特殊通道作用，使某些水溶性化学物得以通过生物膜。

3. 生物膜的多孔性　生物膜上分布有很多直径为 2A～4A 的微孔，它是由贯穿脂质双层的蛋白质的亲水性氨基酸构成，它们是某些水溶性小分子化学物的通道。

外源化学物质在机体内的生物转运机制就是外源性化学物质透过生物膜的机制，其转运方式包括被动转运（passive transport）、特殊转运（special transport）和膜动转运（cytosis）。

（一）被动转运

被动转运（passive transport）是指生物膜两侧的化学物质从高浓度向低浓度扩散，当膜两侧化学物质的浓度梯度逐渐缩小达到平衡状态时，化学物质的扩散作用即停止。此过程不消耗能量，大多数外源化学物质可以通过这种方式透过生物膜。其穿透率的大小与膜两侧的化学物质浓度梯度及化学物质的脂溶性有关。被动转运中最主要的方式是简单扩散和滤过。

1. 简单扩散（simple diffusion）　外源化学物大部分是具有一定脂溶性的大分子有机化合物，可首先溶解于膜的脂质成分而后扩散到另一侧。在此过程中，化学物质不与膜发生反应，也不需要细胞提供能量。简单扩散方式发生的难易程度及其速度主要受以下因素的影响。

（1）化学物质在细胞膜两侧的浓度梯度（concentration）：这个浓度梯度越大，化学物质通过细胞膜的扩散速度越快，两者呈正比。如氧的气体分子由肺泡及毛细血管进入血液和 CO_2

由血液进入肺泡细胞的过程，主要靠浓度差起作用。

(2) 化学物质在脂质中的溶解度：化学物质在脂质中的溶解度以脂/水分配系数(lipid/water partirion coefficient)来表示，该系数是指当一种物质在脂相和水相中的分配达到平衡时，其在脂相和水相中溶解度的比值。凡是脂溶性越大，水溶性越小的物质，它的脂/水分配系数就越大，就越容易通过细胞膜，因为类脂质双分子层允许脂溶性物质通过。因此，能以简单扩散方式通过细胞膜的主要是脂溶性物质和脂肪的溶剂。但是，这种情况仅仅适用于在脂肪和水中的溶解度互相排斥的物质，对于只能全部溶于脂肪或只能全部溶于水或在两者中均难于溶解的物质，则不符合上述规律。因为化学物质在生物体内的扩散除需要通过脂相外，还需要通过水相，因为生物膜的构造包括脂相和水相。因此，脂水分配系数在 1 左右者，更易进行简单扩散。如磷脂是脂溶性的，但由于其在水中的溶解度很低，所以不易进行简单扩散，几乎不存在细胞能直接吸收磷脂现象的发生；而乙醇既有较高的脂溶性，又有较高的水溶性，所以很容易以简单扩散的方式透过生物膜。

(3) 化学物质解离度的大小和体液 pH 值的高低：化合物分子在水溶液中分解成为带电荷离子的过程称为电离。由于解离型化学物质的极性大，脂溶性小，难以通过细胞膜，而非解离型的化学物质极性小，脂溶性大，容易跨膜扩散，因此化学物质在体液中的解离度越大，就越不容易通过细胞膜，相反化学物质在体液中的解离度越小，就越容易通过细胞膜。化学物质在体液中非解离型所占比例的大小取决于该外源化学物质的解离常数 *pKa* 和体液的 pH 值。

pKa 是化学物在溶液中 50%离子化的 pH 值。对于一种物质来说，其 *pKa* 值是固定不变的，但其所处的组织、部位不同，体液的 pH 值不同，这就导致了同一种物质在不同的组织、部位中穿透生物膜的程度不同(表 2-1)。例如：在 pH=1 的介质中，苯甲酸完全不电离，最易透过生物膜；在 pH=4 的介质中则 50%离解；在 pH=7 的介质中完全电离，不能透过生物膜。

表 2-1　毒物在不同 pH 值时的吸收量(%)

化合物	pKa	pH			
		3.6～4.3	4.7～5.0	7.0～7.2	7.8～8.0
酸类	2.3	40	27	<2	<2
硝基水杨酸	3	64	35	30	10
苯甲酸	4.2	62	36	35	15
碱类					
苯胺	4.6	40	48	58	61
氨基比林	5	21	35	48	52
奎林	8.4	9	11	41	54

(引自黄吉武. 毒理学基础. 人民卫生出版社，2009)

2. 膜孔滤过作用(filtration)　水溶性物质随同水分子经生物膜的孔状结构而透过生物膜的过程。凡分子大小和电荷与膜上孔状结构相适应的溶质皆可滤过转运，转运的动力为生物膜两侧的流体静压梯度差和渗透压差。细胞膜具有充满水分的小孔道，它是由嵌入类脂质双分子层中蛋白质的亲水性氨基酸构成。在渗透压梯度和液体静压作用下，大量水可通过这些膜孔。此种孔状结构为亲水性孔道，不同组织生物膜之间的主要差别之一在于孔道的直径不同。肾小球的孔道直径较大，约为 70 nm，相对分子质量为 60 000 以上的蛋白质分子不能透

过，较小的分子可透过。肠道上皮细胞和肥大细胞膜上孔道直径较小，约为 4 nm，相对分子质量小于 200 的化合物方可以通过。一般细胞孔道直径在 4 nm 以下，所以除水分子可以通过外，有些无机离子和有机离子等外源化学物，亦可滤过。

(二) 特殊转运

特殊转运(specialized transport)是指有一定的载体，具有较强的专一性，有一定的选择性和主动性，生物膜主动选择某种机体需要或由机体排出的物质进行的转运。许多不溶于脂质的水溶性大分子化合物、离子和极性物质，由于不溶于脂质而不能进行简单扩散，或因分子过大不能从膜孔滤过，所以它们将通过特殊转运的方式进行运输。这种特殊转运方式包括主动转运和易化扩散两种类型。

1. *主动转运*(active transport)　外源性化学物质借助生物膜上的载体由低浓度处向高浓度处转移的过程。主动转运的主要特点是可逆浓度梯度进行转运，转运过程消耗能量。能量来自细胞代谢活动所产生的代谢能(ATP)的释放。许多外源化学物的代谢产物经由肾脏和肝脏排出，主要是借助主动转运。机体需要的某些营养物质，如某些糖类、氨基酸、核酸和无机盐等由肠道吸收进入血液的过程，必须通过主动转运逆浓度梯度吸收。

近年来对外源化学物质主动转运系统的认识有了重大进展。生物膜的主动转运方式具有下列特点。

(1) 需要有载体参加。载体的容量有限，在底物浓度高时此转运系统可达到饱和，存在转运最大值(T_m)。

(2) 外源化学物质逆浓度梯度(或逆电位)进行转运。此涉及化学物与大分子载体在膜的一侧形成复合物，复合物随之扩散到膜的另一侧并释放化学物，之后载体再返回到原来位置以重复转运过程。

(3) 转运过程需要消耗能量。因此代谢抑制剂可阻止此转运过程。

(4) 载体对转运的外源性化学物质有选择性和特异性。这是因为载体本身具有一定立体构型的特异性，只能允许一定立体构型的化学物通过，对于只有相类似化学结构但不具备相似立体构型的物质不能通过。当不同化学物的特性相似且需要同一载体转运系统时，化学物之间可出现竞争性抑制。

(5) 转运量有一定的极限，当外源化学物达到一定浓度时，载体可达到饱和状态，转运也即达到极限。

主动转运对已吸收的外源化学物质在体内的不均匀分布和排泄具有重要意义，而与吸收关系较小。如铅、镉、砷等外源性化学物能通过肝细胞的主动转运进入胆汁，随胆汁排泄。

2. *易化扩散*(facilitated diffusion)　载体介导的转运，该类转运系统通常用于内源性物质和正常营养物质如葡萄糖等的转运，但也可用于转运与内源性化学物结构相似的外源化学物。易化扩散兼有被动扩散和主动转运的一些特点，如需要载体，顺浓度梯度由高浓度向低浓度转运但不需要细胞供给能量，高浓度底物可使转运系统饱和。

(三) 膜动转运

较大颗粒和大分子的外源性化学物质的转运常伴有膜的运动称为膜动转运(cytosis)，是细胞与外界环境交换一些大分子物质的过程，其主要特点是在转运过程中生物膜结构发生变化，转运过程具有特异性，生物膜呈现主动选择性并消耗一定的能量。膜动转运随机体内化学物质和异物的消除转运均具有重要意义。在一些大分子颗粒物质被吞噬细胞吞噬并由肺泡清

除的过程或被肝和脾网状内皮系统由血液清除的过程都与此有关。膜动转运又可分为胞吞作用(endocytosis)和胞吐作用(exocytosis)。前者是将细胞表面的颗粒物或液滴转运入细胞的过程。后者是将颗粒物和大分子物质由细胞内运出的过程。胞吞和胞吐是两种方向相反的过程。在胞吞作用中如果被摄入的物质为固体则称为吞噬(phagocytosis),如为液体则为胞饮(pinocytosis)。入侵机体细胞的细菌、病毒、死亡的细菌、组织碎片、铁蛋白、偶氮色素都可通过吞噬作用被细胞清除。所以,胞吞和胞吐作用对体内外源化学物或异物的清除转运具有重要意义。

毒物在以上述方式通过生物膜的过程中,对于膜的结构和功能会产生一定的作用,即出现膜毒性。某些化学物质在透过细胞膜的同时会造成膜结构和功能的改变,影响化学物质的被动转运。某些化学物质可通过竞争生物膜的结合部位或者干扰能量供应来抑制主动转运过程,从而又能影响外源化学物质的生物转运过程。因此,通过深入研究毒物与膜的相互作用关系可以使许多毒作用的发生、发展原因得到更为深刻的了解。

二、吸收

吸收(absorption)是外源化学物质经过各种途径透过机体的生物膜进入血液的过程。外源化学物主要通过呼吸道、消化道和皮肤吸收。在毒理学实验中有时也采用特殊的染毒途径如腹腔注射、静脉注射、肌肉注射和皮下注射等。吸收后毒物经血液循环分布到全身各组织细胞内。

(一) 经呼吸道吸收

这是空气中的外源化学物进入机体的主要途径。从鼻腔到肺泡整个呼吸道各部分由于结构不同,对外源化学物的吸收情况也不同,经呼吸道吸收,以肺泡吸收为主。由于肺泡数量多(约3亿个)、总表面积大(50～100 m^2、相当于皮肤表面积的50倍)、肺泡壁薄、遍布毛细血管等解剖生理特点,而且肺泡上皮细胞对脂溶性、水溶性及离子均具有高度的通透性,所以毒物经肺吸收的速度相当快,仅次于静脉注射。另外,经肺吸收的化学物质不通过门静脉进入肝脏解毒而是直接进入体循环,因此经肺吸收的外源性化学物质的毒作用一般表现为快速且毒效应强。鼻腔的表面积虽较小,但鼻黏膜有高度通透性,因此经鼻腔吸收也受到重视。

外源性化学物质由于在空气中存在的状态不同,经呼吸道吸收的机制也是不同的。被肺脏吸收的毒性物质常为气体、挥发性蒸气或可挥发的液体和气溶胶。

1. 气态(气体和蒸气)物质　气态物质经呼吸道的吸收主要发生在肺部,鼻部可以过滤水溶性和高反应性气体,使其不能进入。气态物质到达肺泡后,主要经简单扩散透过呼吸膜而进入血液并溶解,直至血中与肺泡中的气体分子达到平衡为止。其吸收速度及吸收部位受多种因素影响。

(1) 毒物在肺泡和血液中的浓度(分压)差:根据简单扩散的规律,毒物在肺泡空气中的分压越高,吸收越快,随着吸收量的增加,肺动脉血浆中该毒物的分压逐渐增高,并与肺泡气中毒物的分压差逐渐缩小,吸收速度也逐渐减慢,当呼吸膜两侧的分压为0时,即达到动态平衡(饱和状态),此时血液内的毒物浓度(mg/L)与肺泡中毒物浓度(mg/L)之比称为血/气分配系数(blood/gas partition coefficient)。每种气体的血/气分配系数为常数。此系数越大,即溶解度越高,表示该气体越易被吸收入血液。例如乙醇的血/气分配系数为1 300,乙醚为15,二硫化碳为5,乙烯为0.4,说明乙醇远比乙醚、二硫化碳和乙烯易被吸收。

(2) 气态毒物在血液中的溶解度(solubility):在一般情况下,气态毒物的吸收速度与溶解

度成正比，同时还取决于肺通气量和血流量。血/气分配系数低的气态毒物经肺吸收速率主要取决于经肺血流量(灌注限制性)，在血液和气相之间达到平衡时间为 8～21 min。血气分配系数高的气态毒物经肺吸收速率主要取决于呼吸的频率和深度(通气限制性)，在血液和气相之间达到平衡的时间至少为 1 h。

(3) 气态毒物的水溶性：气态物质的水溶性影响其吸收部位，易溶于水的气体如二氧化硫、氯气等在上呼吸道吸收，水溶性较差的气体如二氧化氮、光气等则可深入肺泡，并主要通过肺泡吸收。

2. 气溶胶和颗粒物

气溶胶经呼吸道吸收时，毒物与呼吸道表面接触并附着和阻留，以后逐渐溶解。影响气溶胶吸收的重要因素是气溶胶中颗粒的大小和存在于气溶胶中化学物质的水溶性。气溶胶的沉积部位主要取决于颗粒物大小。一般来说，直径在 5 μm 及以上的颗粒物通常在鼻咽部沉积，在有纤毛的鼻表面黏液层，通过纤毛运动被清除出体内。直径在 2～5 μm 的颗粒物主要沉积在肺的气管、支气管区域，主要通过呼吸道纤毛部分的黏液层逆向运动而被清除。直径在1 μm 及以内的颗粒物可到达肺泡，它们可以被吸收入血或通过肺泡巨噬细胞吞噬移动到黏液纤毛远端的提升装置，并被清除或通过淋巴系统清除。极小的颗粒(直径小于 0.01 μm)则多被呼出。

据粗略估计，吸入肺的颗粒中 25%被呼出，50%沉积于上呼吸道，25%沉积于下呼吸道。肺泡内颗粒物的总体清除率相对较低，第一天只有 20%被清除，存留超过 24 h 的部分清除速度非常缓慢。

(二) 经皮肤吸收

经皮肤吸收是外源化学物由外界穿透皮肤并经血管和淋巴管进入血液和淋巴液的过程。人类的皮肤常常与很多外源性化学物质发生接触，所幸的是，皮肤的通透性不高，一般情况下它成了靶器官和外环境分隔开来相对较好的屏障。但是一些外源化学物质也可透过皮肤而被吸收，达到足够的量时可引起系统效应。例如，氯仿可透过完整健康的皮肤引起肝损害，有机磷杀虫剂和汞的化学物可经皮肤吸收，引起中毒以至死亡。

外源化学物经皮肤简单扩散方式的吸收，主要是通过表皮屏障或皮肤附属器如汗腺、皮脂腺和毛囊吸收。化学物质在进入人皮肤的毛细血管和淋巴管之前必须穿过数层细胞。决定物质被皮肤吸收的速率的关键部位是角质层。它们是表皮最上面的一层，覆盖有浓密的失去细胞核的角质细胞，因此生物学上是没有活性的。所有的毒性物质都是通过被动扩散穿过角质层的。其过程分为两个阶段。

第一阶段：为穿透角质层的屏障作用，但速度较慢。通过皮肤附属器如汗腺、皮脂腺和毛囊吸收途径虽然绕过表皮屏障，比较容易透过毒物，但由于汗腺、皮脂腺和毛囊的总截面积仅占皮肤总面积的 0.1%～1.0%，故此途径不占重要地位。化学物质以简单扩散的方式通过表皮屏障的能力与速度主要与脂溶性有关，化学物质的脂溶性越大越容易渗透。非脂溶性的物质应以滤过方式进入，但是由于角质层细胞所能提供的通道极为有限，而且皮脂腺分泌物具有疏水性，故非脂溶性物质不易通过表皮特别是相对分子量超过 300 的更不容易通过。

第二阶段：为吸收阶段，须经过颗粒层、棘细胞层、生发层和真皮，各层细胞都富有孔状结构，不具屏障功能，外源化学物极易透过，然后通过真皮中大量毛细血管和毛细淋巴管而进入全身循环。由于真皮组织疏松，毛细血管壁细胞具有较大膜孔，所以此时毒物的脂溶性对其通透能力不起决定作用，反过来由于毒物在血液中和进入血液循环前可能遇到的组织和淋巴液

的主要成分是水，所以毒物在那里进一步扩散的速度主要取决于它的水溶性和血流量及组织淋巴液的流动速度。

所以，一种化学物质比较容易地进入血液必须同时具备一定的脂溶性和水溶性。外源化学物质通过皮肤的吸收速度和吸收量受许多因素的影响。

(1) 外源化学物的理化性质：在通过角质层时，分子量的大小和脂/水分配系数的影响较为明显。脂溶性化学物透过角蛋白丝间质的速度与其脂/水分配系数成正比，但在吸收阶段，外源化学物将进入的血液或淋巴液，是同时具有脂溶性和水溶性的液体，所以脂/水分配系数在1左右者，更容易被吸收。非脂溶性的极性外源化学物的吸收与其分子量大小有关，分子量较小者也较易穿透角质层被吸收。

(2) 生物体的皮肤性状：人体不同部位皮肤对外源化学物的吸收能力存在差异，角质层较厚的部位如手掌、足底，吸收较慢，阴囊、腹部皮肤较薄，外源化学物易被吸收(表2-2)。不同物种动物皮肤通透性不同，大鼠及兔的皮肤较猫的皮肤更易通透，而豚鼠、猪和猴的皮肤通透性则与人相似。化学物质经皮肤附属物吸收和在穿透角质层时都有高度的物种依赖性。此外，皮肤血流量和有助于吸收的皮肤生物转化也有物种差异。皮肤吸收的物种差异说明了农药对昆虫和人毒性的不同。例如，对人和昆虫注射途径给予DDT的LD_{50}相近，但当经皮肤接触时，DDT对昆虫的毒性远大于哺乳动物。这可能是由于DDT很容易穿过昆虫的壳质外甲，并且，昆虫相对于其体重的体表面积大。此外表皮损伤可促进外源化学物的吸收。

表2-2　马拉硫磷通过人体不同部位皮肤的吸收

解剖区域	吸收(%)	角质层厚度(μm)	毛囊(cm^2)
阴囊	101.6	5	60
前额	23.2	13	770
手背	12.5	49	18
手掌	5.8	400	—

(引自Poet and McDougal, 2002)

(3) 其他因素：血流速度和细胞间液流动加快，吸收也快；皮肤大量排出汗液，外源化学物容易在皮肤表面汗液中溶解、黏附，延长外源化学物与皮肤接触时间，也易于吸收。

(三) 经胃肠道吸收

胃肠道可被看作是一条贯穿人体的管道，尽管位于体内，却可认为其内容物是在人体外部。外源性化学物质可随同食物或饮水进入消化道并在胃肠道中吸收。毒物的吸收可发生于整个胃肠道，甚至是在口腔和直肠中，但主要是在小肠，因肠道黏膜上有绒毛，可增加小肠吸收面积至200～300 m^2。

1. 外源化学物质经胃肠道吸收的转运方式

(1) 简单扩散：外源性化学物在胃肠道吸收的主要方式。吸收的程度主要取决于胃肠道内的pH值、外源性化学物质的pKa和脂溶性。由于胃肠道各段的pH值相差很大，如胃液酸度极高(pH 1.0～2.0)，有机酸类物质多呈非解离状态，脂溶性大，故容易吸收；相反，有机碱类物质在胃液中呈解离状态，不易吸收。小肠内酸碱度相对趋向中性(pH 6.6)，有机碱类物质在小肠中主要呈非解离状态，易被吸收，相反有机酸类物质如苯甲酸不易被吸收。

(2) 滤过：小肠黏膜细胞膜上有直径0.4 nm左右的亲水性孔道，相对分子质量100左右，

直径小于亲水性孔道的小分子，可随同水分子一起滤过而被吸收。例如，经口摄入的铅盐10%，锰盐4%，镉盐1.5%和铬盐1%可被胃肠道吸收。

(3) 易化扩散和主动转运：哺乳动物的胃肠道有特殊的转运系统（载体介导），可吸收营养物质和电解质（表2-3）。胃肠道也至少拥有一个主动转运系统，可减少外源性物质的吸收。mdr转运体（也称为P-糖蛋白）定位于细胞内，当药物耐受蛋白质的底物进入细胞，它们即被排出到肠腔内。

表2-3 人和动物肠道内特殊转运系统的分布位置

物 质	有吸收能力的位置 小肠			
	较高	中等	较低	结肠
糖（葡萄糖、乳糖等）	++	+++	++	0
中性氨基酸	++	+++	++	0
碱性氨基酸	++	++	++	?
γ-球蛋白（新生动物）	+	++	+++	?
嘧啶（胸腺嘧啶、尿嘧啶）	+	+	?	?
三酰甘油	++	++	+	?
脂肪酸吸收和转化成三酰甘油	+++	++	+	0
胆酸盐	0	+	+++	
维生素 B_{12}	0	+	+++	0
Na^+	+++	++	+++	++
H^+（和/或 HCO_3^- 分泌）	0	+	++	++
Ca^{2+}	+++	++	+	?
Fe^{3+}	+++	++	+	?
Cl^-	+++	++	+	0

（引自李焕德主译. 毒理学基础. 湖南科学技术出版社，2006）

被胃肠道主动吸收的毒性物质数目不多，大多数都通过单纯扩散进入。此外，一些颗粒状物质如偶氮色素及某些微生物毒素可通过胞吞或胞饮作用进入肠黏膜上皮细胞。

2. *外源化学物质经胃肠道吸收的主要影响因素* 影响胃肠道吸收的最主要因素是胃肠道的pH、化学物质的脂溶性和 pKa。此外，还有其他因素，如胃内容物的多少和胃排空时间、肠蠕动和肠排空时间及肠道菌群、胃肠道同时存在的食物和外源化学物、某些特殊生理状况等，在一定程度上也影响外源性化学物质经消化道的吸收。因此，在毒理学研究中应注意控制各种因素，尽量减小对外源性化学物质的吸收和毒性反应的影响。

（四）其他途径吸收

外源化学物通常经上述3种途径吸收。但是，在毒理学动物实验中有时也采用腹腔、皮下、肌肉和静脉注射进行染毒。静脉注射可使外源化学物直接进入血液，分布到全身。腹腔注射因腹腔具有丰富的血流供应和相对广大的表面积，外源化学物的吸收迅速。经腹腔染毒的化合物主要通过门脉循环吸收，因此在其到达其他器官前必先经过肝脏。皮下或肌肉注射时

吸收较慢，但可直接进入体循环。

三、外源性化学物质在体内的分布

分布(distribution)是外来化合物通过吸收部位进入血液或其他体液后，随着血液或淋巴液的流动分散到全身各组织细胞的过程。

化学物质进入血液后将分布到全身各组织细胞，然而这种分布是不均匀的，有些化学物极易透过某些生物膜而分布于全身，而有些化学物不易透过生物膜分布就要受到限制。有些毒物因为蛋白质结合、主动转运或高度脂溶性而在机体的某些部位蓄积。各种生物膜对同一种化学物的通透性也不一致。

研究外源化学物在体内的分布规律，有利于了解外源化学物的靶器官和贮存库。由于化学物质产生毒效应的强度或毒性大小主要取决于该化学物在靶器官中的浓度，毒物在体内的分布过程就成为化学物能否产生毒效应或毒效应大小的关键，在毒理学的研究中具有重要意义。

(一) 化学物在体内的分布规律

化学物被机体吸收后在体内的分布随时间推移而发生变化。在分配的开始阶段，器官或组织内化学物质的浓度主要取决于血液供应量，血供量越丰富的器官，化学物质的浓度越高。随后血液中化学物浓度逐渐降低，体内没有排出的化学物质按它与组织器官亲和力的大小重新分布。最后不能排出的化学物质蓄积于某些脏器或组织，缓慢释放进入血液并排出体外。因此，通过再分配后化学物质浓度较高的部位主要是代谢转化器官、靶器官、排泄器官及贮存库。

(二) 影响化学物在体内分布的因素

许多因素可影响化学物在体内的分布，包括器官组织的血供量和血流速度、化学物在血液中的存在形式、化学物透过生物膜的能力和速度、化学物与器官组织成分的亲和力等。此外，有些器官组织具有特殊的屏障功能，对化学物的分布有重要影响。

1. 外源化学物与血浆蛋白结合　外源化学物进入血液之后往往与血浆蛋白，尤其是血浆白蛋白结合。这种结合是可逆的，它可以视为外源化学物在体内分布运输的一个过程。与血浆白蛋白结合的外源化学物与未结合的游离化学物质呈动态平衡，又由于血浆白蛋白与化学物质结合的专一性不强，所以当有另一种外来化合物或药物或生理代谢产物存在时，可以发生竞争现象。例如，DDE(DDT 代谢物)就可竞争性置换已与白蛋白结合的胆红素，使其在血中游离。

2. 外源化学物与其他组织成分结合　外源化学物还可与其他组织成分结合，如多种蛋白质、黏多糖、核蛋白、磷脂等。这些结合有分布意义，有的也有毒理学意义。例如，一氧化碳与血红蛋白具有高度亲和力，导致缺氧而中毒。又如，除草剂百草枯不论何种途径接触，均可浓集分布于肺引起损伤。

3. 外源化学物在脂肪组织和骨骼中贮存沉积　脂溶性外来化合物可贮存于脂肪组织中，并不呈现生物学活性。只有在脂肪被动用、外源化学物重新成为游离状态时，才出现生物学作用。DDT 在脂肪组织中的贮存即如此。

骨骼也可作为许多外源化学物的贮存沉积场所。例如，铅可取代骨骼中的钙，被机体吸收的铅有 40%可沉积于骨骼中，对机体危害相对较小。在一定条件下，可游离释放进入血液循

环，再次对机体造成损害。

4. 体内各种屏障的影响　屏障是机体阻止或减少外源性化学物由血液进入某种组织器官的一种生理保护机制。机体内较为重要的屏障有血-脑屏障和胎盘屏障等，但这些屏障均不能有效阻止亲脂性物质的转运。

(1) 血-脑屏障(blood-brain barrier)：存在于血液和脑组织之间，由毛细血管壁和脑组织外面的一层脂质细胞所组成。血-脑屏障不是阻止外源性化学物质进入中枢神经系统的绝对屏障，但却比身体任何其他部位都难通过。其解剖和生理上的原因主要有：①中枢神经系统的血管内皮细胞结合紧密，细胞间没有或仅有很小的孔隙。②脑毛细血管内皮细胞含有一种ATP依赖的转运体即多药耐受蛋白(mdr蛋白)，它可将某些化学物质转运回血液。③中枢神经系统的毛细血管很大程度上被胶质细胞(星状细胞)包围。④中枢神经系统组织间液的蛋白质浓度较机体其他部位要低，这就限制了不溶于水的物质穿过细胞转运，因为这些化学物质只有与蛋白质结合才有可能穿过细胞。正是基于以上因素，防止了毒物通过血-脑屏障分布到中枢神经系统，避免对中枢神经系统的毒性。

一般来说，只有游离的毒性物质才能很快地在大脑内达到平衡。脂溶性和离子化程度是化合物进入中枢神经系统速率的主要决定因素。增加脂溶性可提高物质进入中枢神经系统的速率，而离子化则极大地降低了这一速率。一些极少的外源性化学物质可通过载体介导进入脑内。

新生动物的血脑屏障还没有发育完全，这也是吗啡、铅等化学物质对新生儿的毒性较成人大的原因之一。

(2) 胎盘屏障(placental barrier)：母体与胎儿血液循环的间隔，由多层细胞构成。不同物种动物和同一物种的不同妊娠阶段胎盘细胞层数并不一样。例如，猪和马有6层，大鼠、豚鼠只有一层；家兔在妊娠初期有6层，到妊娠末期仅有一层。较薄的胎盘，即细胞层数较少者，外来化合物相对容易透过，例如，大鼠胎盘较人类为薄，外来化合物容易透过，故用受孕大鼠进行致畸试验可能更为敏感。另外，因人与动物的胎盘结构不同，在应用实验动物的毒理学资料时，应予以注意。

胎盘包括主动转运系统和生物转化酶。它们可以保护胎儿不受外源性物质的侵害。大部分外来化合物透过胎盘的机理是简单扩散，而胚胎发育所必需的营养物质，则是通过主动转运而进入胚胎。

(3) 其他屏障：除以上两种屏障外，血-眼屏障(blood-eye barrier)，血-睾屏障(blood-testis barrier)、血-胸腺屏障(blood-thymus barrier)、血-房水屏障(blood-aqueous barrier)等也可以保护这些器官减少或免受外源化学物的损害。

(三) 外源化学物在体内的蓄积

长期接触外源化学物时，如果机体对其吸收速度超过对它的解毒和排泄速度就会导致毒物在体内的含量逐渐增多，通常把这种现象称为毒物在体内的蓄积作用(accumulation)。毒物对蓄积地点可产生毒作用、也可无作用。当蓄积部位与靶器官一致时，易于发生慢性中毒，而当化学物对蓄积部位相对无害时这种组织或器官被称为毒物在体内的贮存库(storage depot)。

从毒理学的角度看，外源化学物在体内的贮存具有双重意义：一方面存在于库内的化学物多数处于无活性状态，对机体不产生毒性作用，因此贮存库可看作是一种保护性的机制，对急性中毒具有保护作用，可减少在靶器官中外源化学物的量；另一方面存在于贮存库中的毒物总是与血浆中游离型的毒物保持动态平衡，当血浆中游离型化合物经生物转化或经机体排泄时，

血浆中化学物浓度降低，贮存库就会释放出更多的外源性化学物质进入血液循环来补充，从而成为血浆中游离型化合物的来源，具有潜在的危害。例如，铅进入机体后80%～90%贮存于骨骼，这部分铅可缓慢释放入血液，引起慢性铅中毒，而当机体过度劳累、紧张或饮酒后，骨骼中的铅可大量释放进入血液，引起明显的急性铅中毒征象。

外源性化学物质的蓄积作用是发生慢性中毒的物质基础，一种外源性化学物质有无蓄积作用是评定该化学物质是否可引起潜在慢性中毒的依据之一，也是制定卫生标准时考虑安全系数大小的一种依据。

在生物体内，化学物的贮存库主要有血浆蛋白、脂肪、骨骼、肾脏等脏器和组织。

1. 血浆蛋白　血浆中各种蛋白均有结合其他化学物质和机体的某些生理成分的功能，如图2-2，清蛋白、转铁蛋白、球蛋白和脂蛋白可以结合大量的化学物质。

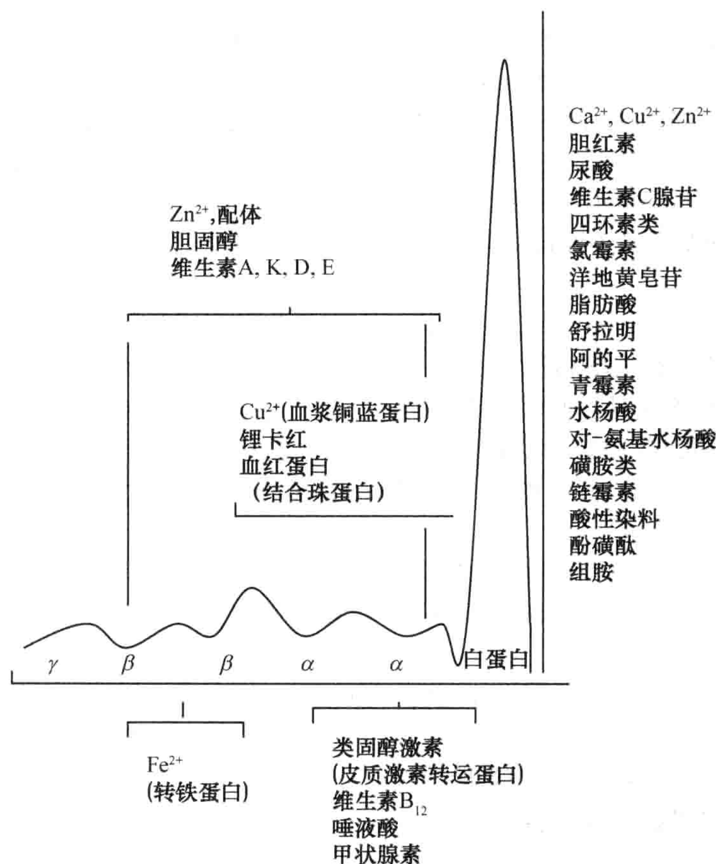


图2-2　配体与血浆蛋白的相互作用

(引自 Casarett and Doull's Toxicology. *The Basic Science of Poisons*. 7th ed. 2008)

蛋白质-配体的相互作用主要是疏水力、氢键和范德华力的作用。因为其分子质量大，血浆蛋白和毒性物质结合后不能跨过毛细血管壁，导致与血浆蛋白结合的毒性物质无法立即分布至血管外的组织或经肾脏滤过，暂无生物效应，可延缓消除过程和延长外源化学物的毒作用。但是，毒性物质与血浆蛋白的结合是可逆的。当游离的化学物质从毛细血管扩散出来时，结合部分则从蛋白质上解离，直到游离部分在血管内、外达到平衡。因此，可以认为血浆蛋白

是暂时贮存库。

不同的外源性化学物质与血浆蛋白的结合是有竞争性的，结合力更强的外源性化学物质可取代已被结合的其他外源性或内源性物质，使之成为游离状态而出现毒性反应。也就是说，如果其他物质在血浆蛋白上取代了毒性物质，血中游离毒性物质的量增加，就可能发生严重的毒性反应，而这又会导致靶器官上毒性物质的平衡浓度升高，产生潜在毒性。

2. 肝和肾　肝和肾具有与许多外源性化学物质结合的能力，这些组织的细胞中含有一些特殊的结合蛋白。如肝细胞中有一种配体蛋白（ligandin）能和许多有机酸结合，而且还能与一些有机阴离子、偶氮染料致癌物和皮质类固醇结合，使这些物质进入肝脏。肝、肾还有一种可诱导蛋白即金属硫蛋白（metallothionein）能与镉、汞、锌及铅牢固地结合，可保护肾小管免受这些重金属对它的损害，但当金属硫蛋白耗竭时也可引起毒性作用。肝、肾既是一些外源化学物贮存的场所，又是体内有毒物质转化和排泄的重要器官。

3. 脂肪组织　许多亲脂性化学物质可通过物理溶解作用贮存在脂肪组织内，往往不具有生物活性。脂/水分配系数大的化学物可大量贮存在脂肪中而降低其在靶器官中的浓度对机体具有一定的保护作用。但是，当机体发生快速的脂肪动员时，脂肪迅速转移，使化学物在血液中的浓度升高，成为潜在危害。

体型肥胖者，脂肪可占体重的50%，而体型消瘦者脂肪占体重的20%，所以在短期内接触毒物时，肥胖者对毒物的耐受性比消瘦者强，但考虑到肥胖者可能使毒物在体内的生物半衰期延长，特别是当毒物对脂肪含量较多的组织有毒性作用时，就可能带来危害。例如，骨髓中含有大量脂肪，而苯的慢性毒作用点正是骨髓，当吸收苯后，苯大量蓄积在脂肪组织中，以后重新释放出来，故肥胖者的血苯浓度下降速度比消瘦者慢，更容易出现慢性苯中毒。

4. 骨骼组织作为贮存库　由于骨骼组织中某些成分与某些外源化学物有特殊亲和力，因此骨骼也就成了某些化学物在体内的主要贮存库。例如，铅和锶可替代骨质中的钙而贮存在骨中。外源化学物在骨中的沉积和贮存是否有损害作用，取决于外源化学物的性质，如铅对骨无毒性，而骨氟增加可引起氟骨症，放射性锶可致骨肉瘤及其他肿瘤，故骨骼也是氟和锶的靶组织。近年来大量体内外研究表明，成骨细胞和破骨细胞是铅毒作用的靶细胞，铅是骨质疏松的潜在危险因素。

四、外源化学物在体内的排泄

排泄（excretion）是外来化合物及其代谢产物向机体外转运的过程，是机体物质代谢全部过程中的最后一个环节。外源性化学物质的排泄过程包括对化学物质原型和其代谢产物以及结合物的排泄。毒物可通过不同的途径排出机体，主要经肾脏、粪便和经肺随呼出气排出，有些化学物还可通过分泌腺随乳汁、汗液、唾液、毛发、指甲等排出体外。化学物在排出过程中，也可能对排泄器官或排出部位造成继发性损害。例如，铅、汞、镉等经肾脏排泄时可导致肾近曲小管损害，砷从皮肤汗腺排出可引起皮炎，汞自唾液腺排出可导致口腔炎等。

1. 经肾脏排泄　肾脏是排泄外源化学物最重要的器官，其排泄的效率极高，其主要排泄机理有肾小球滤过、肾小管重吸收和肾小管分泌。

（1）肾小球滤过：肾小球滤过是一种被动转运，肾小球毛细管的空隙较大（50～100 nm），因此除那些相对分子质量非常大（超过60 000）或与血浆蛋白结合紧密的物质外，大部分外来化合物或其代谢产物均可经肾小球滤过。毒物也可通过被动扩散从肾小管排泄到尿液中。被动扩散进入肾小管中的化合物浓度与其在血液中的浓度呈正比，因此血液中含量越高其消除

速率越大。另一个影响肾小球滤过的因素是毒物与血浆蛋白的结合，此可减少毒物经被动扩散排泄，尤其是那些与血浆蛋白结合紧密或结合率高的毒物，因为只有游离的化合物才会经被动扩散进入肾小管。

(2) 肾小管重吸收：肾小球滤液中含有一些维持机体正常生理功能必需的物质，这些物质将被肾小管上皮细胞重吸收。凡是脂/水分配系数大的化学物质或其代谢产物，可以有效地重吸收，而极性化合物和离子则随尿排泄。由于原尿中水被重吸收，脂溶性物质的浓度增高，可经被动扩散从肾小管回到血液中。脂溶性外源性化学物质的主要吸收地点为肾近曲小管部分，所以许多被重吸收的外源性化学物质对肾脏的损害作用也易在此出现。肾小管尿液的pH可影响弱酸或弱碱性有机化合物的解离度，从而影响它们的排泄率，当尿呈酸性时，有利于碱性毒物的解离和排出，呈碱性时则酸性毒物较易排出。例如，苯巴比妥中毒时可服用碳酸氢钠使尿呈碱性而促进排泄。

(3) 肾小管分泌：外源性化学物质也可通过主动分泌进入尿液排泄。图2-3示肾内各种转运体，有机阴离子转运体(organic-anion transporter, Oat)家族位于近曲小管的基膜，可转运尿酸、磺酰胺类等有机酸。有机阳离子转运体(organic-cation transporter, Oct)家族负责一些阳离子的摄取。一旦外源性化学物质聚集在小管细胞内，就会通过多药耐受蛋白(Mdr)和多重抑制蛋白(Mrp)排入管腔。相反，有机阳离子转运体和肽转运体(PEP2)可以从肾小管重吸收化学物质。

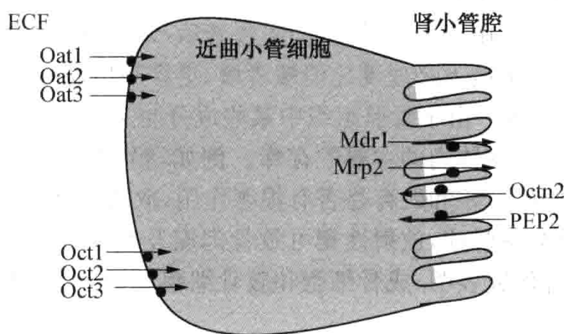


图2-3 肾脏近曲小管的转运系统模型

(引自 Casarett and Doull's Toxicology. *The Basic Science of Poisons*. 7th ed. 2008)

因为肾脏的许多功能在出生时并未发育完善，所以一些外源性物质的清除在新生儿中要比成年人慢，这也是毒性物质的毒性在新生儿要高于成年人的原因。

无论肾脏以哪一种(或多种)方式排出毒物，尿中的毒物浓度一般常与血液中毒物浓度呈正相关。因此，对尿中毒物或代谢产物浓度的测定，往往可间接衡量机体对毒物的吸收或体内毒物的负荷情况。但是，如果停止接触毒物一段时间，由于尿中毒物浓度将随血液中毒物浓度的降低而下降，此时贮存库中可能仍含有大量毒物，在这种情况下，如果尿中毒物浓度的测定值偏低则已无参考意义。

2. 经肝脏随同胆汁排泄　经过肝脏随同胆汁排出体外是外源性化学物质在体内消除仅次于肾脏的另一种排泄途径。来自胃肠的血液携带着所吸收的外来化学物先通过门静脉进入肝脏，然后流经肝脏再进入全身循环。外源性化学物质在肝脏中先经过生物转化，生物转化过程中形成的一部分代谢产物，可被肝细胞直接排入胆汁，再混入粪便排出体外。

外源性化学物质随同胆汁进入小肠后，可能有两种去路：①一部分易被吸收的外源性化学物质及其代谢产物，可在小肠中重新被吸收，经门静脉系统返回肝脏，再随同胆汁排泄，即形成肠肝循环(enterohepatic circulation)。肠肝循环具有重要生理学意义，可使一些机体需要的化合物被重新利用，例如各种胆汁酸平均有95%被小肠壁重吸收，并再被利用。在毒理学方面则由于有些外来化合物的重吸收，使外源化学物从肠道排泄的速度显著减慢，生物半减期延长，毒作用持续时间延长，毒性增加。例如甲基汞主要通过胆汁从肠道排出，由于肠肝循环，使其生物半减期平均达70天。临床上给予甲基汞中毒患者口服巯基树脂，此树脂可与汞化物结合以阻止其重吸收，促进其从肠道排出。②再有一部分外来化合物在生物转化过程中形成结合物，并以结合物的形式出现在胆汁中；肠内存在的肠菌群以及葡萄糖苷酸酶，可将一部分结合物水解，则外源性化学物质可重新被吸收并进入肠肝循环。

图2-4所示，肝脏有多种主动转运系统把外源性化学物质从血浆转运至肝，再由肝运至胆道。钠依赖的牛磺胆酸肽(ntcp)位于肝细胞的肝窦侧转运胆酸如牛磺酸进入肝，而胆盐分泌蛋白(bsep)转运胆酸出肝细胞进入胆道。肝细胞的窦侧膜有很多转运体，包括有机阴离子转运多肽(organic-anion transporting polypeptide, Oatp)1和2，肝特异性有机阴离子转运蛋白(liver-specific organic anion transpoter, Lst)和有机阴离子转运体(Oct)。外源性化学物质一旦进入肝细胞内，就可以被转运入血或转运到胆汁中，或可以被Ⅰ相和Ⅱ相药物代谢酶转化为水溶性更高的物质然后再进入胆汁或返回血液。多药耐受蛋白1(mdr1)和多药耐受蛋白2(mdr2)负责转运外源性物质进入胆道，而多重耐药蛋白3(mrp3)和多重耐药蛋白6(mrp6)则把外源性物质运回血液。

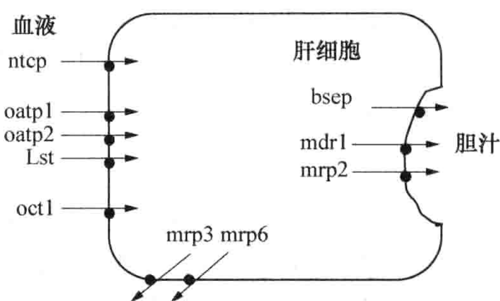


图2-4 肝的转运系统

(引自 Casarett and Doull's Toxicology. *The Basic Science of Poisons*. 7th ed. 2008)

3. 经肺随同呼出气排泄　许多气态外来化合物可经呼吸道排出体外。例如，一氧化碳、某些醇类和挥发性有机化合物都可经肺排泄。其经肺排泄的主要机制是简单扩散，排泄的速度主要取决于肺泡壁两侧有毒气体的分压差、呼吸速度和流经肺部的血液速度。在血液中溶解度较低的气体，如一氧化二氮排泄较快；而血液中溶解度高的物质，如乙醇经肺排出较慢，呼吸速度的影响，在不同化合物略有不同。例如，乙醚在血液中溶解度高，过度通气时，经肺排出极为迅速；而有些不易溶于血液的气体(例如六氟化硫)的排出几乎不受过度通气的影响。

溶解于呼吸道分泌液的外来化合物和巨噬细胞摄入的颗粒物质，将随同呼吸道表面的分泌液排出。

4. 其他排泄途径　外来化合物还可经其他途径排出体外。例如，随同汗液和唾液排泄，随同乳汁排泄等。此种排泄途径虽然在整个排泄过程中所占比例并不重要，但有些却具有特殊的毒理学意义。例如，随同乳汁排泄，许多外来化合物可通过简单扩散进入乳汁。有机氯杀虫剂、乙醚、多卤联苯类、咖啡碱和某些金属都可随同乳汁排出。如果某种物质与母体长期反复多次接触，则容易在乳汁中浓集，重要的意义在于对婴儿的损害作用；因为按单位体重计算，婴儿通过乳汁摄入的外来化合物往往大于一般人群。此外，有些外源化学物可通过汗腺和毛发排泄，因而毛发中重金属等含量可作为生物监测的指标。

第二节　毒物的生物转化

生物转化(biotransformation)或称代谢转化(metabolic transformation),是指毒物在机体内经过多种酶催化或非酶作用转化成代谢物的过程。生物转化是机体对毒物处置的重要环节,是机体维持稳态的主要机制。

生物转化过程通常是将亲脂性化学物转变为极性较强的亲水物质,从而加速其随尿或随胆汁排出。因此,多数毒物经代谢转化后变成低毒或无毒的产物,这种转变叫生物解毒或生物的灭活作用(biodetoxfication)。但是,也有一些本身无毒或低毒的物质经代谢转化后变成了有毒或毒性更大的代谢产物,这种转化叫做生物活化(bioactivation)或生物的增毒作用(toxication)。因此,化学物的生物转化在毒理学上具有灭活和活化两重意义。生物转化的结果使毒物产生毒效应,它在体内的去向分布和排出具有重要影响。

一、生物转化过程

Williams(1959 年)把生物转化分为两种主要类型,即Ⅰ相反应和Ⅱ相反应。Ⅰ相反应即降解反应(degradation reaction),包括水解反应、还原反应和氧化反应,可直接改变物质的基团使之分解并使其增加新的功能基因而增加极性,如—OH、—NH_2、—SH 或—COOH,以利于进行Ⅱ相反应。Ⅱ相反应即结合反应(conjugation),指化学物经第一相反应形成的中间代谢产物与某些内源化学物的中间代谢产物相互结合的反应过程,包括葡萄糖醛酸化、硫酸化、乙酰化、甲基化,与谷胱甘肽结合以及与氨基酸如甘氨酸、牛磺酸和谷氨酸结合等,结果是使化学物的水溶性增加,有利于排出,因此结合反应是一种重要的解毒方式。

这两相反应可在细胞的微粒体、线粒体及胞液中进行,但以微粒体为主。生物转化过程的反应性质较为复杂多样,常见的反应类型如下。

(一) 氧化反应

氧化反应是外源化学物在生物转化过程中获得氧的反应,是生物转化中一个重要过程。有许多外源化学物在生物转化第一相反应中将被氧化形成羟基,亦称羟化反应。外源化学物在体内的氧化反应大致可分为微粒体混合功能氧化酶催化的反应和非为微粒体混合功能氧化酶催化的反应。

1. 微粒体酶促氧化

(1) 脂肪族羟化反应:常见于丁烷、戊烷和己烷等直链脂肪族化合物烷烃类,其羟化产物为醇类。

(2) 芳香族羟化反应:芳香环上的氢被氧化,形成酚类。例如,苯可形成苯酚,苯胺可形成对氨基酚或邻氨基酚。常用的氨基甲酸酯类农药残杀威经机体内氧化亦可形成羟化产物。

(3) N-羟化反应:外源化学物的氨基(H_2N—)上的一个氢与氧结合的反应。由于是在氨基上加入一个氧原子,所以也称为 N-氧化反应。苯胺可代表一种类型。苯胺经羟化后形成羟胺,羟胺的毒性较苯胺本身为高,可使血红蛋白氧化成为高铁血红蛋白。具有毒理学意义的是有些芳香胺类本身并不致癌,经 N-羟化后才具有致癌作用。

(4) 环氧化反应:在微粒体混合功能氧化酶催化下,一个氧原子在外源化学物的两个相邻碳原子之间构成一桥式结构,形成环氧化物。有些环氧化物可以致癌,如氯乙烯的环氧化产物

环氧氯乙烯即为致癌物。有些外源化学物的环氧化物性质极为稳定，可长期在环境和机体脂肪组织中存留。还有些化学物的环氧化物性质极不稳定，将继续发生羟化，形成二氢二醇化合物。环氧化反应可分为脂肪族环氧化反应和芳香族环氧化反应。后者的环氧化产物不稳定，将继续发生羟化。

(5) P-氧化反应：如二苯甲磷，通过氧化反应可生成二苯甲磷氧化物。

(6) S-氧化反应：这一反应多发生在硫醚类化合物，其代谢产物为亚砜，有一部分可继续氧化为砜类。可进行硫氧化反应的外源化学物还有某些有机磷化合物。例如，杀虫剂内吸磷和甲拌磷等、氨基甲酸酯类杀虫剂中的灭虫威及常用药物氯丙嗪。

(7) 氧化性脱卤：在微粒体细胞色素 P450 依赖性单加氧酶催化下，卤代烃类化合物可先形成不稳定的中间代谢产物，即卤代醇类化合物；后者可再脱去卤族元素，形成最终代谢物。典型的氧化脱卤反应可以滴滴涕(DDT)为代表。DDT 经脱卤反应可形成滴滴伊(DDE)和滴滴埃(DDI)。DDE 具有较重要的毒理学意义，脂溶性极高，反应活性较低，可在脂肪组织中大量蓄积，DDT 代谢物的 60%和 DDI 主要由尿中排出。

(8) 氧化性脱氨反应：在微粒体细胞色素 P450 依赖性单加氧酶催化下，在邻近氮原子的碳原子上进行氧化，脱去氨基，形成丙酮类化合物，其中间代谢产物为甲醇胺类化合物。

(9) 氧化性脱烷基反应：与外源化学物分子中 N、S 或 O 原子相连的烷基 α-碳原子被氧化并脱去一个烷基的反应。反应产物为分别含有氨基、羟基、或巯基的化合物并有醛或酮生成。由于反应中有一个 O 原子插入外源化学物的—C—H 键，所以称为氧化脱烷基反应，可分 N-脱烷基反应(如烟碱)、O-脱烷基反应(如对硝基茴香醚)和 S-脱烷基反应。

2. 非微粒体氧化　体内具有催化醇、醛和酮功能基团的化合物的氧化反应的酶类，主要在线粒体和肝组织的胞液中存在，在肺和肾中亦有出现，包括醇脱氢酶、醛脱氢酶和胺氧化酶类，如单胺氧化酶、双胺氧化酶等。

(1) 醇与醛类脱氢反应：分别由醇脱氢酶与醛脱氢酶催化。醇脱氢酶催化醇类氧化形成醛或酮，在反应中需要辅酶Ⅰ及辅酶Ⅱ。醛类氧化反应主要由肝组织中的醛脱氢酶催化。因摄入乙醇经脱氢酶催化而形成的乙醛将继续氧化成为乙酸。乙醇的毒性主要来自乙醛。有人由于遗传缺陷造成醛脱氢酶活力较低，乙醛在体内不易经氧化分解而解毒，饮酒后容易出现乙醛聚积，酒精中毒及酒醉与此有关。

(2) 胺氧化反应：胺氧化酶主要存在于线粒体，可催化单胺类和二胺类氧化反应，形成醛类。根据底物不同，可分为单胺氧化酶(MAO)和二胺氧化酶(DAO)。MAO 可将伯胺、仲胺、叔胺等脂肪族胺类氧化脱去胺基，形成相应的醛类并释放出 NH_3。带有芳香结构的脂肪胺类，例如对氯次苄基胺亦可被氧化，但含有异苯基的胺类，如苯丙胺和麻黄碱两种胺类是经微粒体细胞色素 P450 单加氧酶催化的。DAO 主要催化二胺类的氧化反应，例如腐胺、尸胺等。

(二) 还原反应

在氧张力较低的情况下，还原反应可以进行，所需的电子或氢由 NADH 或 NADPH 供给，催化还原反应的酶类可存在于肝、肾和肺的微粒体或作为可溶性酶存在于胞液中。还原反应除作为独立反应外，还可能是氧化还原可逆反应中的还原反应部分。例如，醇脱氢酶和醛脱氢酶催化的醇、醛氧化反应皆属于可逆反应，当氧化反应达到平衡状态时，即有可能转为还原反应。在氧化反应中一般以 NAD 或 NADP 为辅酶，而在还原反应中的辅酶为 NADH 或 NADPH。催化还原反应的酶类可能与催化氧化反应为同一种酶，但有时也可能由另一种酶进行催化。

1. 微粒体还原　主要包括硝基还原、偶氮还原和还原性脱卤。

(1) 硝基还原反应：硝基基团，特别是芳香族硝基化合物如硝基苯，在还原反应过程中先形成中间代谢物亚硝基化合物，最后还原为相应的胺类。催化硝基化合物还原的酶类主要是微粒体 NADPH 依赖性硝基还原酶。典型的硝基还原反应以硝基苯为例。在反应过程中先形成亚硝基苯和苯羟胺，终产物为苯胺。

(2) 偶氮还原反应：脂溶性偶氮化合物在肠道易被吸收，还原作用主要在肝微粒体以及肠道中进行；而水溶性偶氮化合物虽然可被肝脏胞液以及微粒体中还原酶还原，但由于其水溶性较强，在肠道不易被吸收，所以主要被肠道菌丛所还原，肝微粒体参与较少。脂溶性偶氮化合物经偶氮还原反应先形成含联亚氨基(—NHNH—)的中间产物，然后形成氨苯磺胺。

2. 非微粒体还原　如醛类和酮类还原反应，可分别生成伯醇和仲醇。乙醇在氧化还原反应中可经醇脱氢酶催化氧化为乙醛，同时醇脱氢酶也可催化乙醛还原为乙醇，这是可逆反应中相反方向的反应。

(三) 水解反应与水化反应

在水解反应中，水离解为 H^+ 和 OH^-，并分别与外源化学物分解部分结合，一般不会形成新的功能基团，这是与氧化反应或还原反应的不同之处。水化反应是溶于水中的化合物与水分子通过强亲和力相结合的反应，与水解反应的方向相反。根据反应的性质和机制不同，可分成脂类水解反应、C—N 键水解反应、非芳族杂环化合物水解反应、水解脱卤反应、氧化物水合反应。酯类水解反应由酯酶催化，分解形成带羧基的分子和醇类。

(四) 结合反应

绝大多数外源化学物在第Ⅰ相反应中无论发生氧化、还原或水解反应，最后必须进行结合反应排出体外。结合反应首先通过提供极性基团的结合剂或提供能量 ATP 而被活化，然后由不同种类的转移酶进行催化，将具有极性功能基团的结合剂转移到外源化学物或将外源化学物转移到结合剂形成结合产物。结合物一般将随同尿液或胆汁由体内排泄。

1. 葡萄糖醛酸化　葡萄糖醛酸结合反应在结合反应中占有重要的地位，在许多外源化学物都可进行，如醇类、酚类、羧酸类、硫醇类和胺类等。葡萄糖醛酸为葡萄糖的中间代谢产物，先活化成尿苷二磷酸 α-葡萄糖醛酸(UDPGA)，然后经各种转移酶催化，将葡萄糖醛酸基转移到外源化学物分子。

根据进行结合反应的外源化学物结构及结合方式或部位不同，可分为 O-葡萄糖醛酸结合(醇类、酚类、羧酸胺类)、N-葡萄糖醛酸结合(氨基甲酯类、芳香胺类、磺胺类)和 S-葡萄糖醛酸结合，统称葡萄糖醛酸化。

2. 硫酸化　外源化学物与硫酸根结合反应，外源化学物经第一相生物转化后，分子结构中形成羟基，可与内源性硫酸根结合，有些外源化学物如本身已含有羟基、氨基或羰基以及环氧基即可直接进入第二相反应，发生硫酸根结合，如醇类、芳香胺类和酚类。硫酸根的来源主要是含硫氨基酸的代谢物。在大多数外源化学物的结合反应中，硫酸根结合往往与葡萄糖醛酸结合反应同时存在，如机体接触的外源物较少，则首先进行硫酸根结合，随着剂量增多，硫酸根结合减少，而与葡萄糖醛酸的结合增多。

3. 乙酰化　外源化学物与乙酰基结合的反应，多发生在芳香族伯胺类、磺胺类、肼类化合物的氨基($—NH_2$)或羟氨基。乙酰基由乙酰辅酶 A 提供，反应由乙酰转移酶催化。该酶又可分为 N-乙酰转移酶和 N，O-乙酰转移酶。乙酰结合反应具有多态性，在不同物种，乙酰转移

酶存在一定的差异，对不同的底物有不同的活力，它们的底物专一性和最适 pH 值等都不相同。一般根据异烟肼乙酰结合反应的情况，将人类机体分成快速乙酰化型和缓慢乙酰化型，机体乙酰结合反应速度的个体差异与机体对某些外源化学物的易感性有关，特别表现在芳胺类的致癌作用，如缓慢型人群对联苯胺诱发膀胱癌的作用为易感。

4. 氨基酸化　带有羧酸基的外源化学物与一种 α-氨基酸结合的反应，多发生在芳香羧酸，例如芳基乙酸。参与结合反应的氨基酸主要有甘氨酸、谷氨酰胺以及牛磺酸，较少见的还有天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸以及 N-甘氨酰甘氨酸等。外源化学物的羧基与氨基酸的氨基结合，形成肽或酰胺。此反应需要两种酶的催化作用，即 ATP 依赖性酶和 N-酰基转移酶，前者催化外源化学物羧基活化，后者催化将酰基由外源化学物辅酶 A 衍生物转移给氨基酸上的氨基。

5. 谷胱甘肽化　外源化学物在一系列酶催化下与还原型谷胱甘肽结合形成硫醚氨酸的反应。应具备以下条件：一定程度的疏水性，含有一个亲电子碳原子，可与谷胱甘肽进行一定程度的非酶促反应。这样的化学物主要有卤化物，如烷基卤化物、硝基卤化物、芳基卤化物，各种酯类化合物如磷酸酯类杀虫剂、苯、萘、苯胺等芳烃类及芳胺类化合物和环氧化物等。催化谷胱甘肽结合反应的酶类主要有谷胱甘肽 S-转移酶。另外，值得注意的是有些外源化学物与谷胱甘肽形成的结合物可与生物大分子结合，诱发突变以及癌变，例如氯甲烷和二溴乙烷。

6. 甲基化　在甲基转移酶催化下，将内源性来源的甲基结合于外源化学物分子结构内的反应。有许多内源性和外源化学物可以进行甲基结合反应，与其他结合反应相比，甲基结合后，外源化学物的功能基团未被遮盖，水溶性没有明显增强，有的反而下降；生物学作用并未减弱，有的反而增强，甲基化反应有解毒作用。内源性甲基供体是 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)。能进行甲基结合反应的外源化学物主要有含羟基、巯基或氨基的酚类、硫醇类和各种胺类，还有吡啶、喹啉等含氮杂环化合物。

7. 磷酸化　在 ATP 和 Mg^{2+} 存在下，由磷酸转移酶催化 ATP 的磷酸基转移到相应的外源化学物的反应。在结合反应中不太普遍，常见于 1-萘酚和对硝基酚的反应。

8. 硫氰酸盐化　硫氰酸形成是机体内氰化物代谢解毒的过程，在这一反应中，由硫代硫酸盐提供一个硫原子给氰化物，在硫氰酸生成酶催化作用下形成硫氰酸盐。硫氰酸盐的毒性远远低于氰化物。严格来说，硫氰酸盐形成反应并不是典型的结合反应，因为反应中没有结合剂，且反应产物的极性也不是很强，但它也具有代谢解毒的作用。

二、生物转化酶

生物体始终不断地在接触许多外源化学物并有一系列酶来转化这些化学物。在机体内生物转化的Ⅰ相反应和Ⅱ相反应绝大多数是酶促反应，参与生物转化的酶极为复杂，这些酶主要存在于内质网以及线粒体和胞液中。微粒体是内质网在细胞匀浆过程中形成的碎片部分，含有多种活性的酶系。内质网富含生物转化酶是因为经尿液或胆汁排泄的外源化学物多为脂溶性，在内质网脂质双层中易于溶解进行生物转化。参与反应的有如下酶类。

(一) 细胞色素 P450 酶系

在催化酶类中，最主要的是细胞色素 P450 酶系，亦称为细胞色素 P450 混合功能氧化酶，或细胞色素 P450 依赖性单加氧酶。细胞色素 P450 是一种含亚铁的卟啉蛋白，即血红素蛋白。细胞色素蛋白及其他血红素蛋白在可见光范围内各自呈现典型的吸收光谱。例如，细胞

色素 P450 本身在 420 nm 处出现强吸收光谱,但在还原条件下与 CO 结合后,最强吸收光带在 450 nm 处,因此而得名。无论是催化反应的多样性,还是使化学毒物解毒或活化为活性中间产物的数量,细胞色素 P450 酶系均在生物转化酶中居于首位。

1. 细胞色素 P450 酶系的组成　该酶系主要由 3 个部分组成:①血红素蛋白类(细胞色素 P450 和细胞色素 b_5),它们均含有铁卟啉环结构,具有传递电子的功能。②黄素蛋白类:包括还原型辅酶Ⅱ-细胞色素 P450 还原酶(NADPH-cytochrome P450 reductase)以及还原型辅酶Ⅰ-细胞色素 b_5 还原酶(NADH-cytochrome b_5 reductase),这类酶的功能主要是电子传递作用并提供电子。③磷脂类,主要是磷脂酰胆碱,对膜上各种蛋白酶起固定作用,促进底物的羟化反应,或增强外源化学物与细胞色素 P450 的结合。其中,以细胞色素 P450(以下简称为 P450)最为重要。

2. P450 酶系在氧化反应中的催化功能　细胞色素 P450 酶系的催化反应共由 7 步组成一个循环(图 2-5):①处于氧化态的细胞色素 P450 与底物结合形成复合物;②血红素中的 Fe^{3+} 接受 NADPH-细胞色素 P450 还原酶从 NADPH 转运来的 1 个电子,还原为 Fe^{2+};③1 个氧分子与还原态细胞色素 P450 结合,加上底物形成三元复合物;④该复合物接受第 2 个电子(由 NADPH-细胞色素 P450 还原酶或细胞色素 b_5 转运而来)和 1 个 H^+,成为 $Fe^{2+}OOH$ 复合物;⑤第 2 个 H^+ 的加入使该复合物裂解为水和 $(FeO)^{3+}$ 复合物;⑥$(FeO)^{3+}$ 复合物将氧原子转移到底物,形成氧化的 ROH 产物;⑦释放 ROH 产物,细胞色素 P450 从还原态恢复为氧化态,又可与底物结合,开始新一轮的循环。

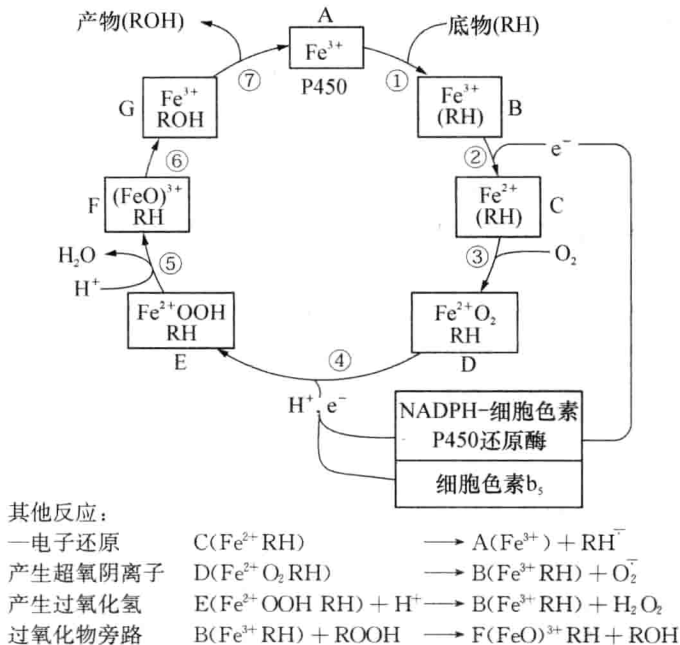


图 2-5　细胞色素 P450 酶系催化的反应循环

(引自庄志雄. 毒理学基础. 人民卫生出版社,2012)

3. P450 酶系催化的主要反应类型　细胞色素 P450 酶系催化的主要反应类型如下。

(1) 脂肪族羟化:亦称脂肪族氧化,是脂肪族化合物侧链(R)末端倒数第 1 个和(或)第 2 个碳原子发生氧化,形成相应的醇或二醇。



$$R—CH_2—CH_3 + [O] \longrightarrow R—CH_2—CH_2OH$$

（2）芳香族羟化：芳香环上的氢被氧化后，形成羟基。例如，苯羟化可以形成苯酚。

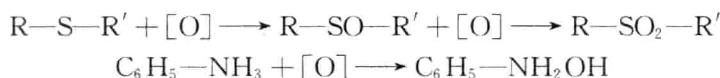


$$C_6H_6 + [O] \longrightarrow C_6H_5OH$$

（3）环氧化反应：在脂肪族和芳香族化合物分子中的两个碳原子间的双键部位加上一个氧原子，形成环氧化物。环氧化是某些化学物质代谢活化的重要步骤，如黄曲霉素 B_1、氯乙烯和苯并(a)芘等可经此反应成为亲电子剂，毒性增强。许多环氧化物仅为中间产物，不够稳定，可很快转化为二氢二醇或羟化产物。但是，当苯环上有卤素取代、或多环芳烃发生环氧化时，形成的环氧化物较为稳定。



（4）杂原子（S—、N—、I—）氧化和 N-羟化：含有硫醚键（—C—S—C—）的化学物质，可发生 S-氧化反应，转化成亚砜或砜，这些氧化产物的毒性可比母体物质增高 5～10 倍。N-氧化的底物多为含有吡啶或喹啉、异喹啉基团的物质。芳香胺类化合物可发生 N-羟化反应，生成羟氨基物，毒性往往升高。



$$R—S—R' + [O] \longrightarrow R—SO—R' + [O] \longrightarrow R—SO_2—R'$$

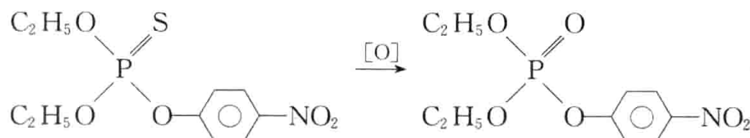
$$C_6H_5—NH_3 + [O] \longrightarrow C_6H_5—NH_2OH$$

（5）脱烷基反应：某些在氧、硫和氮原子上带有烷基的化合物，在代谢过程中脱去烷基称为脱烷基反应。在这类反应中，与化学毒物分子中 N—、O—、S—杂原子相连的烷基加氧羟化，继而发生裂解重排，形成醛或酮。根据发生反应烷基相连的原子不同又分为 N-脱烷基反应，O-脱烷基反应和 S-脱烷基反应。某些化学物质可经此反应而代谢活化。如二甲基亚硝胺经 N-脱烷基后，分子发生重排形成羟化重氮甲烷，再进一步分解产生游离甲基 CH_3^+，可使 DNA 烷基化，导致突变和癌变。



$$R—(NH \cdot O \cdot S)—CH_3 + [O] \longrightarrow R—(NH_2 \cdot OH \cdot SH) + HCHO$$

（6）氧化基团转移：为细胞色素 P450 催化的氧化脱氨、氧化脱硫、氧化脱卤素作用。如苯丙胺经氧化先形成中间代谢产物苯丙甲醇胺，再脱去氨基形成苯丙酮。有机磷农药均可发生脱硫反应，在反应过程中 P═S 基被氧化为 P═O 基。如对硫磷经氧化脱硫后生成对氧磷，毒性增加 3 倍。卤代烃类化合物经此反应先形成不稳定的卤代醇类中间产物，然后脱去卤素形成终代谢物。



（7）酯裂解：酯含有的功能基团裂解后与细胞色素 P450 催化循环中 $(FeO)^{3+}$ 复合物的氧合并为 1 个残基，生成 1 分子醛。如 MFO 催化羧酸酯裂解生成酸和醛。



$$R_1COOCH_2R_2 + [O] \longrightarrow R_1COOH + R_2CHO$$

（8）脱氢：细胞色素 P450 可催化多种化学物质的脱氢反应。如乙酰氨基酚脱氢后形成的

N-乙酰苯醌亚胺具有肝毒性，其他如地高辛、烟碱、丙戊酸等均可发生脱氢反应。

4. P450酶系的来源及分布　细胞色素P450酶广泛存在于各种哺乳动物体内，鸟类、鱼类、两栖类及家蝇和果蝇，甚至细菌和真菌中也含有P450酶。该酶在不同种属中的分布有明显差异，P450对外源化学物的代谢速度为人＜灵长类动物＜狗＜兔＜大鼠＜小鼠。除种属外，同种动物的不同组织中P450含量也有差别，以在肝组织中的活性最高，但在肺、肾、胎盘、小肠、皮肤、肾上腺、睾丸、卵巢、眼、脑等组织中也可检出。细胞色素P450的亚细胞分布也有差别，主要分布于微粒体，但是在线粒体、核、胞质中也存在。所以，可以说细胞色素P450酶系的分布广泛而又复杂，以往的研究均集中于对肝组织的研究，但近些年也开始注意对肝外组织的研究，尤其是肺和肾。

（二）黄素加单氧酶

黄素加单氧酶（flavin-containing monooxygenase，FMO）存在于肝、肾、小肠、脑和肺组织的微粒体中，以黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）为辅酶，催化反应时需要NADPH和O_2。

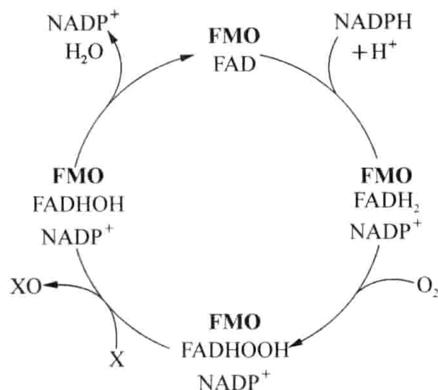


图2-6　黄素加单氧酶催化的反应循环

（引自庄志雄.毒理学基础.人民卫生出版社，2012）

FMO催化的反应包括几个步骤：首先，FMO的辅酶FAD接受NADPH提供的H^+而被还原成$FADH_2$，但氧化态的$NADP^+$仍然结合在酶分子上，并不脱落；随后，$FADH_2$与氧结合形成稳定的过氧化物FADHOOH（即4a-羟基过氧化黄素）；继之与底物结合并将其氧化，FADHOOH转变为FADHOH（4a-羟基黄素）；最后，FADHOH恢复为氧化态FAD，释放出$NADP^+$，准备进入下一个催化循环（图2-6）。

FMO可催化伯胺、仲胺、叔胺、N-乙酰芳草胺、肼、硫醇、硫醚、硫酮、硫代酰胺、膦等物质的N—、S—和P—杂原子氧化，并形成相应的氧化物，这与细胞色素P450催化的反应有一些交叉和重叠，即有些物质是两种加单氧酶的共同底物，但在作用机制上并非完全相同。如吡咯烷生物碱类、千里光碱、倒千里光碱和单猪尿豆碱等由FMO催化形成叔胺N-氧化物而被解毒，而经细胞色素P450代谢后则形成吡咯并最终转化为有毒的亲电子剂。这些反应还存在物种差异。如吡咯烷生物碱对于大鼠为剧毒，对于豚鼠则无毒，原因在于大鼠体内催化吡咯生成的细胞色素P450活性较高，催化叔胺N-氧化物生成的FMO活性较低，而豚鼠体内的代谢情况正好与此相反。

FMO与细胞色素P450另外的不同点是，该酶不能在碳位上催化氧化反应，也不能催化O—、S—、N—杂原子脱烷基反应。

（三）环氧化

环氧化物水化酶（epoxide hydrase，EH），也称为水合酶（epoxide hydratase）及水解酶（eposide hydrase），主要催化脂肪环氧化物和芳烃类环氧化物的水化反应。例如苯乙烯环氧化物水化可形成苯代乙二醇。环氧化物萘-1，2-环氧化物水化产物为萘-二氢二醇。

一般认为EH为解毒酶，但实际上它在某些外源化学物的生物转化中具有活化和失活化双重性，如苯并芘经微粒体混合功能氧化酶催化为几种环氧化合物：苯并芘2，3-环氧化物、4，5-环氧化物、7，8-环氧化物及9，10-环氧化物。其中苯并芘7，8-环氧化物再经水化反

应形成苯并芘 7，8-二氢二醇、苯并芘 7，8-环氧化物和苯并芘 7，8-二氢二醇已为近致癌物，后者将继续进行代谢转化并形成终致癌物，其他环氧化物异构体经重排形成相应的酚，不具有致癌性，且有利于参加各种Ⅱ相结合反应。

(四) N-乙酰转移酶

N-乙酰转移酶(N-acetyltransferase, NAT)主要存在于肝细胞及肺、脾以及胃黏膜等，催化许多化合物的乙酰化反应，例如伯胺、磺胺类和肼类及酰肼等，乙酰基由乙酰辅酶 A 提供。如抗结核药物对氨基水杨酸在体内可乙酰化并以乙酰结合物的形式排出体外。磺胺类药物在生物转化过程中，可进行乙酰结合。

磺胺类化合物的乙酰结合反应在毒理学中有特殊意义。有些磺胺类化合物的结合产物，水溶性降低，如磺胺吡啶和磺胺噻唑的乙酰结合物，易于在肾小管中结晶并造成肾小管损伤。

肼类化合物在 N-乙酰转移酶催化下，也可与乙酰基结合。抗结核药异烟肼摄入机体后绝大部分以乙酰结合物形式排出体外。

(五) 谷胱甘肽 S-转移酶

谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)是谷胱甘肽结合反应的关键酶，催化谷胱甘肽结合反应的起始步骤，主要存在于胞液中。谷胱甘肽 S-转移酶有多种形式，根据作用底物不同，至少可分为下列 5 种。

1. 谷胱甘肽 S-烷基转移酶　催化烷基卤化物和硝基烷类化合物的谷胱甘肽结合反应，主要存在于肝脏和肾脏。

2. 谷胱甘肽 S-芳基转移酶　主要催化含有卤基或硝基的芳烃类或其他环状化合物的谷胱甘肽结合反应，如溴苯和有机磷杀虫剂等，主要存在于肝脏胞液。

3. 谷胱甘肽 S-芳烷基转移酶　催化芳烷基的谷胱甘肽结合反应，如苄基氯等芳烷卤化物等，主要存在于肝脏和肾脏。

4. 谷胱甘肽 S-环氧化物转移酶　催化芳烃类和卤化苯类等化合物的环氧化物衍生物与谷胱甘肽结合，主要存在于肝肾胞液。

5. 谷胱甘肽 S-烯烃转移酶　催化含有 α，β-不饱和羰基的不饱和烯烃类化合物与谷胱甘肽的结合反应，主要存在于肝肾胞液。

谷胱甘肽 S-转移酶在毒理学上有一定的重要性。它可以催化亲核性的谷胱甘肽与各种亲电子外源化学物的结合反应。许多外源化学物在生物转化第一相反应中极易形成某些生物活性中间产物，它们可与细胞生物大分子重要成分发生共价结合，对机体造成损害。谷胱甘肽与其结合后，可防止发生此种共价结合，起到解毒作用。

(六) 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶属于金属酶，随金属的差异，该酶可分为 Cu、Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD 4 种。因其存在部位的不同，有不同活性作用。其中，Cu、Zn-SOD 在结构上与其他两种 SOD 差别较大，而 Mn-SOD 与 Fe-SOD 之间差别较小。Fe-SOD 主要存在于原核生物中。

(七) 过氧化氢酶

过氧化氢酶存在于红细胞及某些组织内的过氧化体中，它的主要作用就是催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2，使得 H_2O_2 不至于与 O_2 在铁螯合物作用下反应生成非常有害的—OH。

三、影响生物转化的主要因素

外源化学物在体内的生物转化复杂多变，其主要的原因是代谢过程可受多种因素的影响，包括机体的遗传生理因素和环境因素两大类。遗传生理因素有动物种属、性别、年龄等，常常体现在代谢酶的种类、数量和活性的差异上，代谢酶的多态性也是影响毒性反应个体差异的重要因素。各种环境因素主要通过影响代谢酶和辅酶合成过程以及催化过程来干扰外源化学物的生物活化，如代谢酶的诱导和抑制。此外，其他因素如机体的营养状态、疾病等也会影响代谢转化。

（一）代谢饱和

外源化学物在生物体内可有多种代谢途径，产生不同的代谢物。各种代谢途径的酶活力和生物转化能力都有一定限度，随着化学物吸收剂量或浓度的增加，通过某种途径进行生物转化的能力就会达到饱和，这种化学物的代谢途径就会发生改变。所以，化学物进入机体的剂量往往可以影响其生物转化途径，改变代谢产物。例如，临床上常用的退热镇痛药对乙酰氨基酚（扑热息痛），过量使用会引起人和实验动物肝坏死。有研究表明，对乙酰氨基酚在体内有 3 种代谢途径：①与硫酸结合；②与葡萄糖醛酸结合；③经细胞色素 P450 酶催化氧化反应，产生活性代谢产物（N-乙酰对苯醌亚胺）。正常情况下对乙酰氨基酚进入体内后可通过与 GSH 结合而解毒。当对乙酰氨基酚在低剂量时（大鼠 15 mg/kg），90％以上是经与硫酸结合，在高剂量时（大鼠 300 mg/kg）仅 43％与硫酸结合，其余大部分是通过与葡萄糖醛酸结合或与 GSH 结合，这样当过量使用对乙酰氨基酚时可由于其代谢途径的改变导致体内 GSH 耗尽而引起肝脏毒性。

（二）代谢酶多态性

外源化学物代谢酶的遗传差异是不同个体间和种族间对外源化学物的毒性和肿瘤易感性差异的原因之一。早在 20 世纪 50 年代国外已有学者提出遗传影响生物代谢，导致某些外源化学物对生物体的毒性效应。现已查明，有 50 种遗传变异可使人对致癌物、环境毒物的易感性增高。人的遗传因素对外源化学物在体内的代谢途径起着重要作用。参加生物转化Ⅰ相反应和Ⅱ相反应的代谢酶的多态性已成为毒理学研究的热点。其中细胞色素 P450 的多态性可能是生物代谢种属差异的基础。人类生物代谢酶的遗传变异最好的例子就是 N-乙酰转移酶（NAT）。NAT 是机体内代谢转化含氮药物和芳香胺类化学物的关键酶系。根据遗传变异的基因型，NAT 的酶多态性分为快型和慢型，快型是常染色体显性遗传，慢型是常染色体隐性遗传。两种基因型在世界各地区各民族之间存在很大差异，NAT 慢型者在白人中约占 50％，在东方人中占 15％～20％。NAT 快、慢型之间酶的活力有很大差别，是某些药物产生不良反应的重要原因。例如，异烟肼引起的周围神经病变及肝损害，普鲁卡因酰胺和肼苯达嗪引起的红斑狼疮等均主要发生在 NAT 慢型者。近些年研究发现，NAT 慢型者接触芳香胺类化学物容易发生膀胱癌，我国某地区人群中 NAT 慢型者患肝癌的危险度约为快型者的 6 倍。GSH-S-转移酶（GST）是重要的解毒酶系，GST 的酶多态性对于解释职业中毒的人群差异，检出高危人群进行健康监护都有重要意义，是今后亟须开展的研究课题。

（三）代谢酶的诱导和抑制

人体在生产和生活环境中往往同时接触多种化学物质，尤其是同时服用某些药物或嗜烟、酒。这些化学物质中如果含有某种能诱导或抑制代谢酶，则可改变其他毒物的代谢。很多毒

物可有多种代谢途径，产生多种生物学活性不同的代谢产物，这些途径之间的平衡和竞争对于毒物的毒性有重要意义。当代谢酶被诱导/激活，如该毒物在体内是经代谢活化，则表现出毒性增强；经代谢转化减毒的毒物，则表现为毒性降低。当代谢酶被抑制/阻遏，则得到相反的结果。

有些毒物可使某些毒物代谢酶系合成增加并伴活力增强，此种现象称为酶的诱导(induction)，凡具有诱导效应的毒物称为诱导剂(inducer)，大多是一些有机化合物，如某些药物、杀虫剂、致癌剂等均可诱导微粒体酶。

许多毒物对代谢酶产生抑制作用(inhibition)。抑制作用可以分为以下6种类型。

(1) 抑制物与酶的活性中心发生可逆或不可逆性结合。如对氧磷能抑制羧酸酯酶，以致马拉硫磷水解速度减慢，加强马拉硫磷的生物学作用，表现为对昆虫杀虫效果增强，对人畜毒性增高。

(2) 两种不同毒物在同一个酶的活性中心上发生竞争性抑制。如1,2-亚乙基二醇和甲醇中毒，此两种毒物经醇脱氢酶催化代谢而导致毒性，临床上给予乙醇治疗，因乙醇与此酶有更大的亲和力，故可降低1,2-亚乙基二醇和甲醇的代谢和毒性。

(3) 破坏酶。如四氯化碳、氯乙烯、肼等的代谢产物可与P450共价结合，破坏其结构和功能。

(4) 减少酶的合成。如氯化钴抑制涉及血红素合成的δ-氨基酮戊酸合成酶，并增加血红素氧化酶活性，故可抑制P450酶系活性。

(5) 变构作用。如一氧化碳可与P450结合，引起变构作用，阻碍其与氧结合。

(6) 缺乏辅因子。如马来酸二乙酯可耗尽GSH，抑制其他毒物经GSH结合代谢。

(四) 代谢的种属差异和个体差异

不同种属体内的代谢酶有较大的差异，甚至同一种属不同品系之间也有差异。某些种属缺乏相应的酶或特异酶反应，或种属之间酶的水平差异很大。猫缺乏葡萄糖醛酸转移酶，狗缺乏N-乙酰转移酶，猪缺乏硫酸转移酶。性别对代谢酶活性也有影响，例如，雄性成年大鼠环氧化物水解酶活性高于雌性2倍，混合功能氧化酶活性也高于雌性。此外，生物转化作用还受年龄、肝脏疾病及药物等体内外各种因素的影响。例如，新生儿由于生物转化酶发育不全，对药物及毒物的转化能力不足，容易发生药物及毒素中毒，老年人由于器官功能退化，对氨基吡啉、保泰松等药物转化能力减低，用药后药效较强，不良反应较大。

(五) 生物转化作用的复杂性

毒物各种类型生物转化的重要性与宿主、环境化学因素及毒物剂量有很大关系。因为不同生物转化过程所产生的代谢产物在作用上有着显著性差异，化学物的毒性会随着这些因素而改变。因此，化学物在生物体内的代谢转化是一个十分复杂的过程，分析一种化学物的毒性需要结合多方面因素综合考虑。

第三节 毒物动力学

毒物动力学是从速率论的观点出发，用数学模型分析和研究化学毒物在体内吸收、分布、代谢和排泄过程及其动力学的规律，其目的在于：①有助于毒理学研究的设计(如剂量和染毒

途径选择)；②通过对暴露、时间依赖性的靶器官剂量与毒作用关系研究，解释毒作用机理；③确定有关剂量、分布、代谢和消除的参数，用以进行对人的危险性评价。

一、经典毒物动力学

经典动力学的基本理论是速率论和房室模型。

房室模型(compartment model)是用来描述毒物在体内的分布情况，房室模型是假设机体像房室，毒物进入体内可分布于房室中，由于分布速率的快慢，可分为一室开放模型、二室开放模型或多室模型(图 2-7)。通常将化学毒物内转运的速率过程分为一级、零级和非线性 3 种类型。

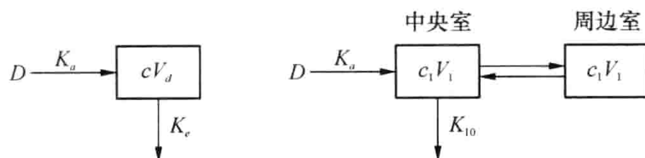


图 2-7 一室和二室开放模型

(引自王心如. 毒理学基础. 人民卫生出版社，2003)

(一) 时量曲线

血浆毒物浓度随着时间变化的动态过程，可以用时量关系来表示。在染毒后不同时间采血样，测定血浆中毒物的浓度，以血浆中毒物浓度为纵坐标，时间为横坐标绘制曲线即为毒物浓度时间曲线(concentration-time curve)，简称时量曲线，通过曲线可定量地分析毒物在体内动态变化。毒物在体内的吸收、分布、代谢及排泄过程是同时进行的。时量曲线实际上是吸收、分布速率和消除速率的代数值。

非静注染毒的时量曲线(图 2-8)可分为 3 期：潜伏期、持续期及残留期。潜伏期(latent period)是染毒后到开始出现毒作用的一段时间，主要反映毒物的吸收和分布过程。静注染毒时一般无潜伏期。峰时间(peak time)是指染毒后达到最高浓度的时间。峰浓度(peak concentration)与毒物剂量成正比，峰浓度超过最低有害浓度时，就会出现毒作用。持续期(persistent period)是指毒物维持有害浓度的时间，其长短与毒物的吸收及消除速率有关。残留期(residual period)是指体内毒物已降到有害浓度以下，但尚未从体内完全消除。残留期的长短与消除速率有关。残留期长反映毒物在体内储存，多次反复染毒容易引起蓄积中毒。

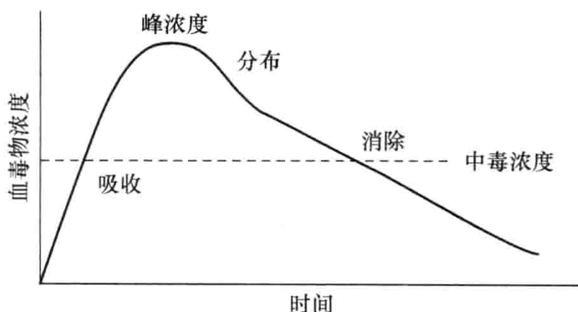


图 2-8 非静注染毒的时量曲线

(引自王心如. 毒理学基础. 人民卫生出版社，2003)

（二）常用毒物动力学参数及其概念

毒物动力学每一个基本过程如吸收、分布、代谢和排泄，都可以用一些参数来描述这些过程出现的程度和速率，也就是说，毒物动力学参数可说明化学毒物在体内吸收、分布和消除的动力学规律。其中，K_a、T_m、C_m、AUC和F表示化学毒物吸收程度和速度，V_d代表化学毒物分布情况，K、CL和$t_{1/2}$反映化学毒物消除的特点。

（1）吸收速率常数（absorption constant，K_a），峰浓度（peak concentration，C_m），峰时间（peak time，T_m）均表示毒物吸收程度和特点。

（2）曲线下面积（area under curve，AUC）：指时量曲线下覆盖的总面积，单位为mg/（h·L）。AUC表示经某一途径给以毒物后一定时间内吸收入血的毒物相对量。在静脉染毒时，$AUC = X_0/(V_d \cdot K_e) = C_0/K_e$。

（3）生物利用度（bioavailability，F）：又称生物有效度，是指毒物被机体吸收利用的程度，完全吸收时生物利用度为1。

经口生物利用度是指经口染毒的AUC与该毒物静注后的AUC的比值，常用经口吸收百分率表示。$F = (AUC_{po}/AUC_{iv}) \times 100\%$。

（4）表观分布容积（apparent volume of distribution，V_d）：在体内达到动态平衡时，体内毒物量（D）与血浆中毒物浓度（C）的比值，表示毒物以血浆毒物浓度计算应占有的体液容积，单位用L或L/kg表示。由于它并不代表真正的容积，所以称为表观分布容积，用于推测毒物在体内分布范围的宽窄。

$$V_d = D/C;\ V_d = D_0\text{（静注毒物量）}/C_0\text{（零时毒物浓度）}$$

式中：V_d为表观分布容积；D为体内毒物量；C为血浆毒物浓度。

V_d=血浆容量，说明毒物只分布在血液中；V_d=体液总量，说明毒物在体液中分布均匀；V_d>体液容量，说明组织摄取量大，毒物与组织蛋白结合或对药物有特殊亲和力，药物贮存于某些特定组织中。

（5）消除速率常数（eliminatlon constant，K_e）：表示体内消除毒物的快慢，可以用单位时间内体内毒物被消除的百分率表示，其单位为/h。K_e值大，说明消除速率快。如某化学毒物K_e为0.25/h，表示每小时可消除体内毒物量的25%。

（6）廓清率（clearance，CL）：廓清是指将毒物从血液循环中清除的过程。对整体动物而言清除率是指在单位时间内，从体内清除表观分布容积的部分，即每单位时间多少升血中毒物量被清除，其单位为L/h或L/（h·kg）。实际上就是体内毒物总负荷量在单位时间内经循环进入消除器官的比例。当毒物流经某一消除器官时，每单位时间被消除的毒物量叫消除速度（rate of elimination，RE），其单位为g/h。被消除的毒物的百分数叫消除率（eliminstion ratio，ER），用%表示。

按清除途径不同，可有肾清除率（CL_r），肝清除率（CL_h）。血浆清除率则是肾和肝清除率的总和。$CL = V_d \cdot K_e$或$CL = D/AUC$

（7）半衰期（half-lives，$t_{1/2}$）：体内血液中毒物浓度下降一半所需的时间，它是表示毒物消除速度的参数，$t_{1/2}$=0.693/k，不受浓度所制约。$t_{1/2}$短，说明毒物消除迅速，不易蓄积中毒。在一级消除动力学，$t_{1/2}$不受血毒物浓度和染毒途径的影响，肝肾功能不全可能延长$t_{1/2}$。

（8）房室（compartment）概念：生理学将体液分为血浆、细胞外液及细胞内液等几个部分（房室），药代动力学的房室概念与此不同，它是一种抽象的数字概念，其划分取决于毒物在体

内的转运速率。当毒物在体内转运速率高，体内分布迅速达到平衡时，可将机体看成单一房室模型。如果毒物在体内不同器官被认为是中央室，对于血流量少而穿透率慢的器官，不能立即与血液中毒物达到平衡，被认为是周边室，因此可把机体设想为二室或多室模型。大多数毒物在体内的转运和分布是符合二室模型的，但经过一段时间（分布相）体内毒物分布达到平衡后，其消除率恒定时，此时两室可视为一室。

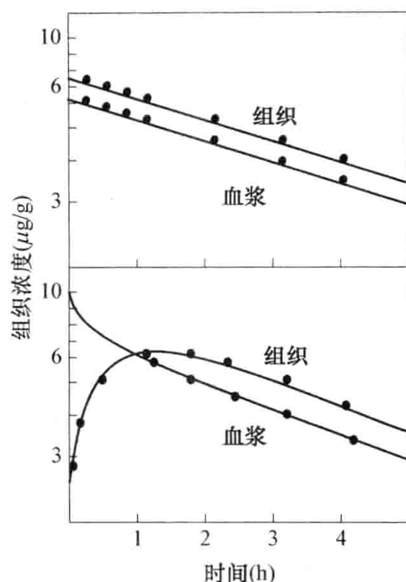


图 2-9　静注染毒的一室和二室模型时量曲线

（引自张桥. 毒理学基础. 人民卫生出版社，2003）

（三）一室和二室开放模型

1. 一室开放模型（open one compartment model）当毒物吸收入血循环后，立即均匀分布到全身体液和各组织器官中，迅速达到动态平衡，称为一室开放模型，见图 2-9。D 为染毒剂量，K_a 为吸收速率常数，C 为血毒物浓度，V_d 表现分布容积，CV_d 为体内毒物量，K_e 为消除速率常数，E 为消除毒物量。

2. 二室开放模型（open two compartment model）当毒物在体内组织器官中分布速率不同，毒物先进入中央室，包括全血和血流充盈的器官如肾、脑、心、肝等。然后，较缓慢地进入周边室，如血管供应较少、血流缓慢的脂肪、肌肉、皮肤等。中央室和周边室之间的转运是可逆的，K_{12}是毒物从中央室转至周边室的一级动力学速率常数；K_{21}是毒物从周边室转至中央室的一级动力学速率常数；达到动态平衡时，两室间的转运速率相等，$K_{12} = K_{21}$。二室模型有 3 个亚型，毒物只能从中央室消除的亚型最为常用。大多数毒物在体内的转运和分布符合二室开放模型。

二、生理基础药物动力学模型

经典毒物动力学房室模型的研究已有多年历史，目前仍被广泛应用，但它也存在许多缺点。组成模型的基本单位“房室”，仅仅是一个数学上的抽象概念，缺乏实际的解剖学、生理学意义。20 世纪 60 年代中后期，Bischoff 和 Dedrick 等开始了比较可行的“生理药动学”的研究。生理基础药物代谢动力学模型（physiologically based pharmacokinetics modeling，PBPK）描述了动物的生理解剖并提供了一些参数，如血流、通气速率、代谢常数、组织可溶性和大分子结合等。

PBPK 模型是将每个器官或组织按照解剖结构作为一个房室并用心血管系统将它们联系起来。毒物在各房室里的实际血流流速取决于毒物在组织中的可溶性。毒物在房室里的转运是符合简单扩散定律的，也就是说，毒物的转运是与浓度梯度呈正比的。

$$\partial C/\partial t = K \cdot \Delta C/V$$

式中：C 为房室内毒物浓度；ΔC 为浓度梯度；V 为房室容积。

当扩散、转运限定，转运常数 K 就相当于进入房室的血流速度（Q）。浓度梯度则是进入房室动脉血的毒物浓度（Ca）与从房室出来的静脉血的毒物浓度（Cv）间的差异。

$$\partial C/\partial t = Q(Ca - Cv)/V$$

毒物在房室中的浓度分成两部分：体液内游离的部分（相当于静脉端的浓度）和组织中结合的部分。这两者间的分配比例(P)决定于毒物在组织内的可溶性和分配系数：

$$P = C/Cv$$
$$\partial C/\partial t = Q(Ca - C/P)/V$$

这是PBPK模型的基本关系，对于那些非代谢、非消除和非组织结合的房室也可适用。

(一) 模型建立

1. 选择适当的组织房室　常用的方法是通过对每个器官和组织的描述，将整个身体都模式化。在大多数情况下只作选择性模式化。这就需要了解毒物的理化性质、毒作用途径和机制，以摸清完整模型中的房室情况。对于脂溶性物质需要将脂类组织判为单独的房室并将非靶器官进行归类，如高灌流器官（肾脏）和低灌流器官（皮肤和肌肉）。这些同类器官就可以有相同的动力学表现。

PBPK模型对各生理室可分为：①灌注限制室，组织室摄取外来化合物的速率受到达该组织的携带该物质的血液速率的限制，而与该物质跨越细胞膜的速率无关。在多数组织是灌注速率限制的。②扩散限制室，外来化合物被摄入室内的速率由细胞膜的渗透性和膜的总面积决定，被称之为扩散限制模型。当外来化合物的转运速率或跨越细胞膜的转运慢于到达该组织的血流速度时，发生扩散限制转运。

在灌注限制模型，毒物经组织室时的变化规律，根据质量平衡原则，当毒物随血流进入某组织后，组织中药量的变化速度应为：

(1) 无清除作用的组织

$$V_{ts} \times \mathrm{d}C/\mathrm{d}t = Q_{ts} \times C_{in} - Q_{ts} \times C_{out}$$

式中：V_{ts} = 组织的解剖容积；Q_{ts} = 组织血流量；C_{in} = 流入（动脉）血中毒物浓度；C_{out} = 流出（静脉）血中毒物浓度。

(2) 有清除作用的组织

$$V_{ts} \times \mathrm{d}C/\mathrm{d}t = Q_{ts} \times C_{in} - Q_{ts} \times C_{out} - CL_{ts} \times C'_{ts}$$

式中：CL_{ts} = 组织对毒物的清除率；C'_{ts} = 组织中游离毒物浓度。

在稳态时，组织中的药量基本保持不变。

$$V_{ts} \times \mathrm{d}C/\mathrm{d}t = 0;\ CL_{ts} \times C'_{ts} = Q_{ts} \times C_{in} - Q_{ts} \times C_{out}$$

得出 $CL \cdot C_{in} = Q_{ts} \cdot C_{in} - Q_{ts} \cdot C_{out}$；式中：$CL$ = 该组织对毒物的表观清除率。

即：毒物在某一组织累积速率＝（进入该组织动脉血流速率×血毒物浓度）－（流出该组织静脉血流速率×血毒物浓度）－（毒物在组织中生物转化/排泄速率）

进而得出：$CL = Q_{ts}[(C_{in} - C_{out})/C_{in}] = Q_{ts} \cdot E$；

式中：E 为提取率[Extraction ratio，$E = (C_{in} - C_{out})/C_{in}$]。

在组织中，真正被清除的是游离型毒物，而组织中的游离型毒物浓度又等于从组织流出的静脉血中游离型毒物浓度。因此，

$$CL \cdot C_{in} = CL_{int} \cdot f \cdot C_{out} = Q_{ts} \cdot C_{in} - Q_{ts} \cdot C_{out}$$

式中：CL_{int} 代表组织的固有清除率，反映组织对毒物进行清除的真实能力；f 代表血液中

毒物的游离分数。

根据质量平衡原则，对每一生理室可以列出一个微分方程描述化学毒物在室内动态变化，设计多少个生理室，就可写出多少个方程，这一套方程组即是生理毒物动力学模型的表达方式。

2. *收集资料和解方程组*　选定模型后应收集所需的资料，一般包括：①解剖学参数，模型中每个生理室的解剖容积。②生理学参数，血流速率、肺泡通气和肝、肾脏消除率。③热力学参数，外来化合物的分配或分布系数。④转运，外来化合物穿过界膜时的转运速率。然后，进行必要的动物实验。

3. *模型的验证和修订*　模型的验证是通过对模型的实际应用和考察来确认的。生理模型的特点之一可将动物实验的结果外推到人类，这就比其他数学模型更有条件来进行验证和确认。任何一个有价值的模型在建立时都要有一个反复验证、反复修订和不断完善的过程，以便达到最终的研究目的。

(二) PBPK 模型的应用

1. *危险度评价*　PBPK 模型在毒理学上最常见的应用是对人类健康危险度评价进行剂量分级。利用化学物靶组织的剂量可为危险性评定的剂量-效应关系研究提供可靠基础，可能预测和估算不同暴露方案、途径、剂量和毒物的靶组织剂量，有助于降低传统外推方法的不确定性，包括从一种接触条件向另一种接触条件(接触程度、时间、途径和方式)、从一个种属向另一个种属(实验动物向人)以及从一个群体向另一群体(一般群体向敏感群体)所作外推时的误差。

2. *接触限值的制定和修订*　一般都用毒物空气浓度的监测来评价工业毒物的职业接触情况。由于生物利用度和代谢作用，空气中毒物的剂量并不一定是吸收的剂量。除了吸入以外，其他因素也会影响体内的负荷水平。目前，用生物监测技术来正确地测定实际接触剂量，用生物材料中化学物可接受水平作为生物接触指数(biological exposure indices，BEIs)。PBPK 模型可通过接触水平来推断不同体液和组织中的毒物浓度，从而确定 BEI 值。

3. *改进毒性实验的实验设计*　使用 PBPK 模型可以了解在不同接触条件下外剂量与内剂量之间的关系，对这种复杂动力学的了解有助于选择适当的毒理学实验剂量。特别是对癌的生物学测定，常常强调使用最大耐受量。如果用 PBPK 模型作预测，一般只需小量的动物，如果是用于慢性毒性试验，可以增加试验的信息量并且减少动物用量。

(三) PBPK 模型的不肯定性和局限性

由于模型所使用的资料存在一些不能避免的偏差，PBPK 模型难免有一定的不确定性，特别是模型的选择和参数的估计，所以该模型用于预测时需要有各水平上的可信限，也就是说，需要测定 PBPK 模型的敏感性或变异性。因此，PBPK 模型不能用于超过自身可信范围去进行外推，并且自身必须先得到验证。

(王素华，高艳荣)

第三章　毒作用及其影响因素

第一节　毒效应谱和毒作用类型

一、毒效应谱

机体暴露外源化学物后，由于外源化学物的性质和剂量的不同，引起机体多种生物学变化，称为毒效应谱（spectrum of toxic effects），随剂量逐步增加可表现为：①机体对外源化学物的负荷增加；②意义不明的生理和生化改变；③亚临床改变；④临床中毒；⑤死亡。机体负荷是指在体内化学物和（或）其代谢产物的量及分布。亚临床改变、临床中毒、死亡属于损害作用（毒效应），毒效应谱还包括致癌、致突变和致畸作用。

适应（adaptation）是机体对一种通常能引起有害作用的化学物无易感性或易感性降低。抗性（resistance）是一个群体对于应激原化学物反应的遗传学改变，以致于与未暴露的群体相比有更多的个体对该化学物不易感性，因此抗性产生必须有化学物的选择及随后的繁殖遗传。耐受（tolerance）对个体是指获得对某种化学物毒作用的抗性，通常是早先暴露的结果，对该化学物毒作用反应性降低的状态。引起耐受的主要机制可能是由于到达毒作用靶部位的化学物量的降低（处置性耐受）或某组织对该化学物的反应性降低。耐受也用于在暴露前即具有高频率的抗性基因的群体。

二、毒作用类型

外源化学物对机体的毒作用可分为以下 5 类。

（一）速发性或迟发性毒作用

速发性毒作用（immediate toxic effect）是指一次暴露于某外源化学物后短时间内出现或发生的毒作用。例如，氰化钾和硫化氢等引起的急性中毒。迟发性毒作用（delayed toxic effect）是指一次或多次暴露于某外源化学物后经一定时间间隔才出现的毒作用。例如，有机磷类化合物暴露后发生的迟发性神经毒作用。对于外源化学物的致癌作用，人类一般要在初次暴露后 10～20 年才能出现肿瘤。

一般说来，机体暴露化学物后迅速中毒，说明化学物在体内吸收、分布快，作用直接；反之，

则说明其吸收缓慢或在作用前需经代谢转化。中毒后迅速恢复，说明化学物能很快被排出或被解毒；反之，则说明解毒或排泄效率低，或已产生病理或生化方面的损害以致难以恢复。相比之下，大部分毒物仅引起速发毒性效应而不产生迟发毒性效应。

（二）局部或全身毒作用

局部毒作用（local toxic effect）是指某些外源化学物在机体最初暴露部位直接造成的损害作用。例如，暴露在腐蚀性的酸碱所造成的皮肤损伤，吸入刺激性气体引起的呼吸道损伤等。全身毒作用（systemic toxic effect）是指外源化学物被机体吸收进入血液并分布至靶器官或全身后所产生的损害作用，例如，一氧化碳引起机体的全身性缺氧。除了具有高度反应活性的物质外，大多数化学物都引起全身毒作用，也有些物质两种类型毒作用都有。例如，四乙基铅在皮肤吸收部位对皮肤发生毒作用，随后进行全身转运，对中枢神经系统和其他器官产生毒作用，出现典型的中毒效应。如果局部毒作用极为严重，也可能会间接地引起全身毒作用。例如，严重酸灼伤后出现的肾损伤就是一种间接性全身毒作用，因为毒物并未曾到达肾脏。

（三）可逆性或不可逆性毒作用

可逆性毒作用（reversible toxic effect）是指机体停止暴露外源化学物后可逐渐消失的毒作用。一般情况下，机体暴露外源化学物的浓度愈低，时间愈短，造成的损伤愈轻，则脱离暴露后其毒作用消失得就愈快。不可逆性毒作用（irreversible toxic effect）是指机体在停止暴露外源化学物后其毒作用继续存在，甚至对机体造成的损害作用可进一步发展。例如，外源化学物引起的肝硬化、肿瘤等就是不可逆的。化学物的毒作用是否可逆，在很大程度上还取决于所受损伤组织的修复和再生能力。例如，肝脏具有较高的再生能力，大多数肝损伤是可逆的；反之，中枢神经系统的损伤，多数是不可逆的。化学物的致癌与致畸毒作用一旦发生，通常被视为不可逆性的。

（四）超敏反应

超敏反应（hypersensitivity）是机体对外源化学物产生的一种病理性免疫介导有害反应。引起这种超敏反应的外源化学物称为致敏原，致敏原可以是完全抗原，也可以是半抗原。许多外源化学物作为一种半抗原，当其进入机体后，首先与内源性蛋白质结合形成抗原，然后再进一步激发免疫系统。当再次暴露该外源化学物后，即可产生超敏反应。超敏反应可分为Ⅰ～Ⅳ型，其中Ⅰ型也称之为变态反应（allergic reaction），变态反应的群体剂量-反应曲线极难获得。对特定的个体来说，变态反应可与剂量有关，例如，一个对花粉过敏的人，其发病是与空气中花粉的浓度有关的。此外，由于变态反应是非期望的、有害的不良反应，显然其也是一种毒性作用。致敏作用有时极为严重甚至引起死亡。

（五）特异质反应

特异质反应（idiosyncratic reaction）是由遗传因素决定的、对外源化学物产生的异常生物反应。主要由于基因多态性，而与免疫性超敏反应无关。例如，病人接受一个标准治疗剂量肌肉松弛剂琥珀酰胆碱（succinylcholine），一般情况下引起的肌肉松弛时间较短，因为它能迅速被血清胆碱酯酶（cholinesterase）分解。有些病人由于这种酶的缺乏，可出现较长时间的肌肉松弛甚至呼吸暂停。又如，体内缺乏 NADH 高铁血红蛋白还原酶（NADH reductase）的人，对亚硝酸盐及其他能引起高铁血红蛋白症的外源化学物异常易感。

超敏反应和特异质反应的发生主要取决于机体因素，因此在群体中仅在少数人有反应，效应与剂量无相关，在实验动物难以复制模型。

一种外源化学物的毒效应可能涉及上述几种分类。例如，强酸可引起皮肤的局部毒作用，并且是立即作用，但早期是可逆的。氯乙烯在较低剂量的长期暴露可引起肝血管肉瘤，但在一次高剂量暴露可引起麻醉作用和肝毒性。青霉素对某些个体引起的变态反应是间接作用，有时是立即的全身毒作用，此作用可能是可逆的。

第二节　毒作用机制

毒性作用机制主要研究化学物是如何进入机体的、如何与靶分子交互作用、机体是如何应对这种侵害的过程。机制研究具有重要的实践和理论价值：①机制信息为解释描述性毒理学资料、评估某外源化学物引起有害效应的概率、确定预防和拮抗毒性作用的方法、制定预防策略、设计危害程度较小的药物和工业化学物，以及开发对靶生物具有良好选择毒性的杀虫剂等方面提供了理论依据；②对外源化学物毒作用机制的深入研究，有利于人们对外源化学物毒作用部位、生理、生化以及人类某些重要疾病病理过程的进一步认识。

由于存在大量潜在的毒物以及许多可能被损害的生物学结构和过程，因而也就存在着大量可能的毒性作用和可能的机制过程。尽管对某些外源化学物毒作用机制进行了深入的研究，但大多数毒物的毒作用机制尚未完全阐明。本节重点介绍在对人类和试验动物的研究过程中已经确认或暂已认定的毒作用机制。多数毒物发挥其对机体的毒性作用一般经历 4 个阶段：①毒物从暴露部位转运到靶部位；②毒物在靶部位与内源靶分子反应；③毒物引起细胞功能失调；④机体启动修复机制及修复失调。

一、毒物从暴露部位到靶部位

理论上毒效应的强度主要取决于终毒物在其作用靶部位的浓度及持续时间。终毒物(ultimate toxicant)是指与内源靶分子(如受体、酶、DNA、微丝蛋白、脂质)反应或严重地改变生物学微环境、启动结构和(或)功能改变的化学物，常为机体所暴露的原化学物或其代谢产物。靶分子上终毒物的浓度取决于毒物在靶部位浓度增加或减少过程的相对效力。毒物的吸收、作用部位的分布、重吸收以及代谢活化过程促进终毒物在其靶部位的蓄积，而毒物进入体循环前的排除、毒物从作用部位分布到其他部位、毒物的排泄和代谢解毒则与上述过程相反，减少终毒物在靶部位的蓄积(图 3-1)。

(一) 从暴露部位进入体循环

1. *毒物的吸收*　吸收(absorption)是某种毒物从暴露部位转运到体循环的过程。绝大多数毒物通过细胞扩散穿越上皮屏障到达毛细血管。其吸收率与其在吸收表面的浓度有关，取决于暴露速率及化学物的溶解度。毒物吸收率与暴露部位的面积、发生吸收过程的皮肤特征(如皮肤角质厚度、上皮下微循环)以及毒物的理化性质有关。脂溶性通常是影响毒物吸收的最重要理化特征。一般而言，脂溶性化学物比水溶性化学物更容易吸收。

2. *毒物进入体循环前的排除*　毒物从机体暴露部位转运到体循环过程中可能被排除(elimination)，这对于从胃肠道吸收的化学物并不罕见，因为这些化学物在通过体循环分布到机体其他部位之前，必须首先通过胃肠道黏膜细胞、肝脏和肺。肠上皮细胞和肝细胞均含有丰富的药物(毒物)代谢酶和药物(毒物)转运蛋白。毒物经胃肠道吸收进入体循环之前，一部分在药物(毒物)转运蛋白作用下从肠上皮细胞快速泵回肠腔，一部分在肠肝药物(毒物)代谢酶

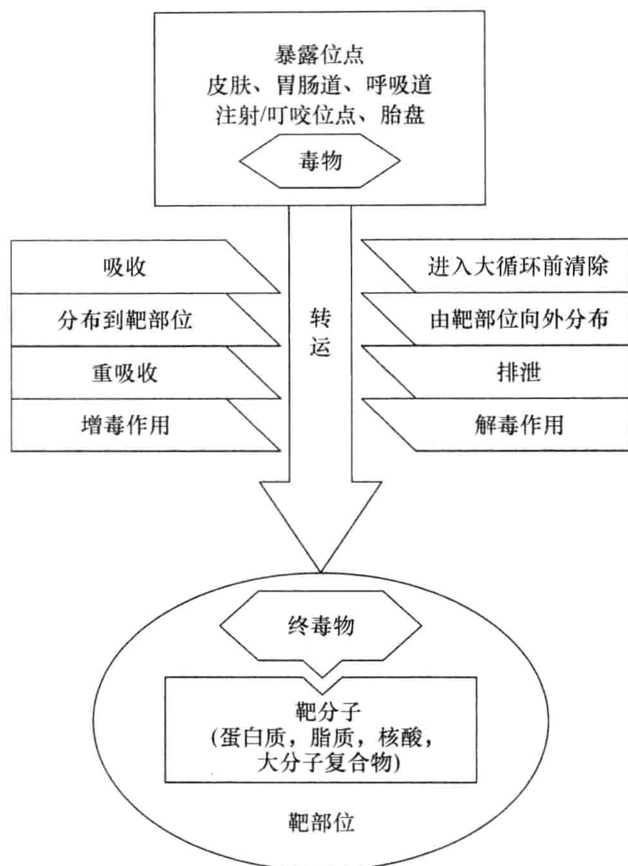


图 3－1　毒性发展的第一阶段：毒物从暴露部位转运到靶部位

(引自 Klaassen CD ed. *Casarett and Doull's Toxicology* (7th ed. 2007)

作用下迅速代谢，最终只有一部分毒物可越过黏膜屏障进入体循环。例如，乙醇在胃黏膜被肠上皮细胞醇脱氢酶氧化；环孢素 A 在胃肠道吸收过程中部分被 P－糖蛋白(一种 ATP 依赖的外源化学物转运蛋白)从肠上皮细胞泵回肠腔，部分在肠上皮细胞被细胞色素 P450 (CYP3A4)羟化代谢；吗啡在肠黏膜和肝脏中发生葡糖苷酸化作用；锰从门脉血进入肝脏，从胆汁排泄。这样的一些过程可阻止相当数量的毒物到达循环血中。苯巴比妥、利福平、地塞米松等代谢酶诱导剂诱导肠上皮细胞和肝细胞毒物代谢酶基因表达，加速毒物在肠肝的代谢，最终减少毒物进入体循环；而细菌脂多糖抑制肠、肝药物(毒物)代谢酶和药物(毒物)转运蛋白的表达，增加毒物进入体循环。因此，体循环前或首过消除可减小通过体循环途径到达靶部位的化学物的毒效应。

(二) 从体循环进入靶部位

在分布相，外源化学物离开血液循环进入细胞外间隙，并可能进入细胞。溶解在血浆中的外源化学物通过毛细血管内皮经水相细胞间隙和穿细胞孔道(称为细胞窗孔)和(或)穿越细胞膜而扩散。影响毒物分布的主要因素有：脂溶性、分子大小与形状、电离度。脂溶性化合物迅速通过扩散进入细胞，相反地，高度离子化和亲水性的外源化学物(如筒箭毒碱和氨基糖苷)主要局限于细胞外空间，除非有特异的膜载体系统可用于转运这类毒物。毒物通过分布过程到

达其作用靶部位，也可能分布到增毒的部位，通常是细胞内的酶，这里是终毒物形成部位。某些机制促进毒物分布到其靶部位，而另一些机制则推迟毒物分布到靶部位。

1. *促进毒物分布到靶部位的机制* 毒物分布到靶部位可因下列因素而增加。

(1) 毛细血管内皮的多孔性：肝窦和肾小管周围毛细血管具有较大的孔道(直径 50～150 nm)，可容许与蛋白质结合的外源化学物通过，这有利于化学物在肝脏与肾脏的蓄积。

(2) 专一化的穿质膜转运：毒物可通过专一化的离子通道和膜转运蛋白转运到细胞内靶部位。例如，钠钾 ATP 酶促进一价铊离子的蓄积；电压门控的 Ca^{2+} 通道容许阳离子如铅或钡离子进入可兴奋细胞；借助于载体蛋白的转运，百草枯进入肺细胞、α-蕈毒环肽和微囊藻毒素进入肝细胞，赭曲霉素和汞离子的半胱氨酸结合物进入肾小管细胞。

(3) 细胞器内的蓄积：具有可质子化的胺基和亲脂特征的两性外源化学物可蓄积在溶酶体和线粒体并引起不良效应。溶酶体中的蓄积是通过 pH 陷阱(trapping)作用(即非质子化的胺扩散进入酸性的细胞器内部被质子化，从而阻止其外流)。胺与溶酶体磷脂的结合削弱了其降解作用，引起磷脂沉着症。线粒体蓄积过程的发生是通过离子渗透来实现的，胺在膜间腔(线粒体逐出质子处)被质子化，由此形成的阳离子借助于此处强烈的负电势(－220 mV)而吸引进入基质腔，损害 β-氧化与氧化磷酸化过程。例如，重要的抗心律失常药胺碘酮(amiodarone)通过"陷入"肝脏溶酶体和线粒体中，分别引起磷脂沉着症、微囊型脂肪变性及其他肝损害。

(4) 可逆性细胞内结合：黑色素(melanin)是一种细胞内的多聚阴离子芳香族聚合物，这种色素的结合作用是某些化学物如有机和无机阳离子及多环芳烃蓄积在含色素的细胞中的一种机制。黑色素结合毒物的释放被认为是引起氯丙嗪和氯喹相关的视网膜毒性、MPTP 和锰引起的黑质神经元损害以及多环芳香化合物导致黑色素瘤的原因。

2. *妨碍毒物分布到靶部位的机制* 下述 5 个过程妨碍毒物向特定部位的分布。

(1) 血浆蛋白的结合：一旦外源化学物如 DDT 和 TCDD 与血浆高分子量蛋白质或脂蛋白结合，就不能通过扩散透过毛细血管，即使其透过孔道离开血液，亦难以渗透过细胞膜。绝大多数外源化学物必须与蛋白质解离才能离开血液进入细胞。因此，化学物与血浆蛋白的牢固结合推迟并延长了其毒效应及其排出。

(2) 专一化的屏障：脑毛细血管具有很低的水渗透性，因为它们的内皮细胞缺乏孔道并通过极其紧密的连接联系在一起。这种血-脑屏障阻止亲水化学物进入脑，除了那些能被主动转运的化学物。生殖细胞与毛细血管之间被多层细胞分隔，精母细胞被支持细胞(Sertoli cell)包裹，这种细胞紧密联结形成血-睾屏障。因此，水溶性毒物很难进入生殖细胞。亲水性毒物在穿越胎盘屏障过程中也受到限制。然而，所有这些屏障对脂溶性毒物均无效。

(3) 贮存部位的分布：外源化学物蓄积在某些组织或细胞中却不产生毒性效应。例如，高亲脂性的物质如氯代烃杀虫剂蓄积在脂肪细胞中，而铅通过取代羟磷灰石中的 Ca^{2+} 而沉积在骨骼中。这种贮藏减少了外源化学物在其靶部位的利用度而作为一种暂时的保护机制。然而，当脂肪快速消耗时，杀虫剂可从脂肪细胞中返回到体循环并分布到神经组织靶部位。这可能是暴露于杀虫剂的鸟类迁徙期间和冬季食物受限时死亡的原因之一。

(4) 与细胞内结合蛋白的结合：毒物与细胞内非靶部位的结合也能暂时减少其在靶部位的浓度。例如，在急性镉中毒时金属硫蛋白(一种富含半胱氨酸的胞浆蛋白)与镉结合以减轻镉对细胞的毒性作用。

(5) 从细胞内排出：细胞内的毒物可转运回细胞外间隙。这种现象发生于脑毛细血管内

皮细胞。这些细胞在其腔膜上含有一种ATP依赖的膜转运蛋白，称之为多种药物耐受(multidrug resistance, mdr)蛋白或P-糖蛋白，这种蛋白质可将化学物从细胞内排出，对血-脑屏障有重要作用。例如，与正常小鼠比较，*mdrla*基因缺陷小鼠脑中双氢除虫菌素水平及其对双氢除虫菌素敏感性高100倍，双氢除虫菌素是一种神经毒性杀虫剂和人类驱虫药，是许多P-糖蛋白底物中的一种。卵母细胞、肠上皮细胞、肝细胞和肾小管上皮细胞均表达丰富的P-糖蛋白。胎盘组织丰富的P-糖蛋白对阻止环境致畸物通过胎盘屏障引起对胎儿的损害有重要的保护作用。

(三) 增毒与解毒

1. 增毒　许多外源化学物(如强酸与强碱、烟碱、氨基糖苷、环氧乙烷、甲基异氰酸盐、重金属离子、HCN、CO)具有直接毒性作用，而另外一些毒物的毒性主要是由于其代谢物引起。外源化学物在体内经生物转化为终毒物的过程称为增毒(toxication)或代谢活化。对于某些外源化学物，增毒过程赋予了它们的生物学微环境和结构发生不良变化的理化特征。例如，由乙二醇形成的草酸可引起酸中毒和低血钙以及因草酸钙沉淀而导致肾小管堵塞。有时化学物通过生物转化而获得更有效地与特定受体或酶相互作用的结构特征和反应性。例如，有机磷杀虫剂对硫磷可转化为一种高活性的胆碱酯酶抑制剂对氧磷；杀鼠药氟乙酸盐在三羧酸循环中转变为一种抑制顺乌头酸酶的假底物氟柠檬酸。然而，最为多见的情况是，增毒使外源化学物不加区别地与带有易感功能基团的内源性分子反应。这种反应性的增加是由于它们转变为：①亲电物(electrophiles)；②自由基(free radicals)；③亲核物(nucleophiles)；④氧化还原性反应物(redoxactive reductants)。

(1) 亲电物：亲电物是指含有一个缺电子原子的分子，带部分或全部正电荷，这使它能通过与亲核物中的富含电子原子共享电子对而发生反应。亲电物的形成涉及许多化学物的增毒作用，这样的反应产物常常通过插入一个氧原子而产生，该氧原子从其附着的原子中获得一个电子，使其具有亲电性，如醛、酮、环氧化物、芳烃氧化物、亚砜类、亚硝基化合物、磷酸酯和酰基卤类等。另一种情况是共轭双键形成，它通过氧的去电子作用而被极化，使得双键碳之一发生电子缺失(即成为亲电子剂)，这种情况发生于α、β-不饱和醛和酮以及醌和醌亚胺(quinoneimines)形成时，许多这些亲电代谢物的形成是由P450催化的。

阳离子亲电物是通过键的异裂作用而形成的。例如，7，12-二甲基苯并蒽等芳香烃甲基取代物以及2-乙酰氨基芴等芳香胺化合物先被羟化，分别形成苄基醇和N-羟基芳香胺化合物(酰胺)。通常此类产物随后在磺基转移酶的作用下发生酯化，所形成的酯类化合物中的C—O或N—O键发生异裂反应，分别形成硫酸氢盐阴离子和苄基正碳离子以及硫酸氢盐阴离子和芳基正氮离子。金属汞氧化为Hg^{2+}，CrO_4^{2-}还原为Cr^{3+}，AsO_4^{3-}还原为AsO_3^{2-}或As^{3+}则是无机化合物形成亲电毒物的例子。

(2) 自由基：自由基是在其外层轨道中含有一个或更多不成对电子的分子或分子碎片。自由基可由分子(或分子片断)接受一个电子或丢失一个电子，或者通过共价键均裂而形成。外源化学物如百草枯(paraquat)、多柔比星(doxorubicin)和呋喃妥因(nitrofurantion)能从还原酶接受一个电子而形成自由基。这些自由基典型地将额外电子转移到分子氧，形成超氧阴离子自由基($O_2^{-\cdot}$)并再生为容易重新获得新电子的外源化学物原型。通过这种“氧化还原循环(redox cycling)”，一个电子受体的外源化学物分子能生成许多$O_2^{-\cdot}$分子。同时还有内源形成的$O_2^{-\cdot}$，在“呼吸暴发(respiratory burst)”时，这种自由基在活化的巨噬细胞和粒细胞中

由 NADPH 氧化酶大量生成，也可由线粒体电子传递链特别是在解耦联状态时产生。$O_2^{-}\cdot$ 的重要性很大程度上是由于 $O_2^{-}\cdot$ 是两种增毒途径的启动物质：一是导致过氧化氢的形成，然后形成羟基自由基（$HO^{\cdot}$）；而另一个则是产生过氧亚硝基[peroxynitrate（$ONOO^{-}$）]，最终形成二氧化氮（$^{\cdot}NO_2$）和碳酸盐阴离子自由基（$CO_3^{-}\cdot$）。

亲核外源化学物如酚类、氢醌、氨基酚、胺、肼、酚噻嗪类和巯基化合物在由过氧化物酶所催化的反应中易丢失一个电子并形成自由基。有些亲核外源化学物如儿茶酚类和氢醌可连续发生两次单电子氧化，首先产生半醌自由基，然后形成醌。醌不仅是具有反应活性的亲电物，而且也是具有启动氧化还原循环或使巯基和 NADPH 氧化的电子受体。电离电压很低的多环芳烃如苯并(a)芘和 7，12-二甲基苯并蒽可通过氧化酶或细胞色素 P450 单电子氧化为自由基阳离子，它们可能是这些致癌物的终毒物。如同过氧化物酶一样，氧合血红蛋白（Hb-FeⅡ-O_2）能催化氨基酚氧化为半醌自由基和醌亚胺，这是增毒作用的另一个实例，因为这些产物接着又使亚铁血红蛋白（Hb-FeⅡ）氧化成不能携带氧的高铁血红蛋白（Hb-FeⅢ）。

自由基也可由电子向分子转移而引起键均裂（还原裂解）形成。通过电子从细胞色素 P450 或线粒体电子传递链转移的过程（还原脱卤），这种机制参与 CCl_4 转变为三氯甲基自由基（$Cl_3C^{\cdot}$）。$Cl_3C^{\cdot}$ 与 O_2 反应形成反应性更强的三氯甲基过氧自由基（$Cl_3COO^{\cdot}$）。具有最重要的毒理学意义的自由基——羟基自由基（$HO^{\cdot}$）也由均裂生成。在电离辐射时这一过程从水中产生大量 $HO^{\cdot}$。过氧化氢（HOOH）还原均裂为 $HO^{\cdot}$ 和 HO^{-} 的过程称为 Fenton 反应，这是由过渡金属催化的，典型的有 Fe（Ⅱ）、Cu（Ⅰ）、Cr（Ⅴ）、Ni（Ⅱ）或 Mn（Ⅱ），它是 HOOH 及其前体 $O_2^{-}\cdot$ 的主要增毒机制，同时也是过渡金属的增毒机制。此外，能络合过渡金属的化学物如氨三乙酸、博来霉素和丝膜蕈毒的毒性也是基于 Fenton 反应，因为络合增加了某些过渡金属离子的催化效率。吸入的矿物颗粒如石棉和二氧化硅的肺毒性至少部分是由颗粒表面上的 Fe 离子触发的 $HO^{\cdot}$ 形成所引起的。过氧化氢是几种酶促反应的直接或间接副产物，包括单胺氧化酶、黄嘌呤氧化酶和酰基辅酶 A 氧化酶，它通过自发的或超氧化物歧化酶催化的 $O_2^{-}\cdot$ 的歧化而大量产生。

均裂也参与 $ONOO^{-}$ 形成自由基的过程，$ONOO^{-}$ 很容易与普遍存在的 CO_2 反应产生亚硝基过氧碳酸盐（$ONOOCO^{-}$），它可自发地均裂为两种自由基：氧化剂与硝化剂二氧化氮（$^{\cdot}NO_2$）和氧化剂碳酸阴离子自由基（$CO_3^{-}\cdot$）。因此，$ONOO^{-}$ 及其以后的自由基形成代表着 $O_2^{-}\cdot$ 与 $^{\cdot}NO$ 的增毒机制。

（3）亲核物：亲核物的形成是毒物活化作用较少见的一种机制。例如，苦杏仁经肠道细菌 β-糖苷酶催化形成氰化物；丙烯腈环氧化和随后谷胱甘肽结合后形成的氰化物以及硝普钠经巯基诱导降解后形成的氰化物；CO 是二卤甲烷经过氧化脱卤的有毒代谢产物；一种强亲核物和还原剂硒化氢是由亚硒酸盐与谷胱甘肽或其他巯基反应形成的。

（4）活性氧化还原反应物：除了上述那些机制外，还存在着特殊的产生活性氧化还原反应物的机制。例如，硝酸盐通过肠道细菌还原、亚硝酸酯或硝酸酯与谷胱甘肽反应而形成产生高铁血红蛋白的亚硝酸盐；氨苯砜羟胺和 5-羟伯氨喹啉（分别为氨苯砜和伯氨喹啉的羟化代谢物）通过协同氧化作用而引起高铁血红蛋白的形成）；还原剂如抗坏血酸以及还原酶如 NADPH 依赖的黄素酶使 Cr（Ⅵ）还原为 Cr（Ⅴ）。氧化还原循环形成的外源性自由基以及 $O_2^{-}\cdot$ 与 $^{\cdot}NO$ 能还原结合于铁蛋白的 Fe（Ⅲ），随后以 Fe（Ⅱ）形式将其释放，由此形成的 Cr（Ⅴ）和 Fe（Ⅱ）催化 $HO^{\cdot}$ 形成。

总之，大多数反应性代谢物是缺电子的分子或分子片段，如亲电物和中性或阳离子自由基。

虽然某些亲核物是具有反应性的(例如 HCN、CO),但许多亲核物是通过转变为亲电物而活化。同样,具有多余电子的自由基在 HOOH 形成并接着发生均裂后引起中性 $HO^{\cdot}$ 而导致损害。

2. 解毒 消除终毒物或阻止其形成的生物转化过程称为解毒(detoxication)。在某些情况下,解毒可与增毒过程竞争某一外源化学物。解毒可以 6 种途径进行,取决于有毒物质的化学特征。

(1) 无功能基团毒物的解毒:一般而言,无功能基团的化学物如苯、甲苯以两相方式解毒。首先,功能基团如羟基或羧基被引入到分子中,最为常见的是通过细胞色素 P450 酶,随后一种内源性的酸如葡萄糖醛酸、硫酸或氨基酸通过转移酶加入功能基团中,最终的产物为失活的、高度亲水的、易于排泄的有机酸。

(2) 亲核物的解毒:亲核物一般通过在亲核功能基团上的结合反应来解毒。羟化的化合物通过硫酸化作用、葡萄糖醛酸化作用,偶尔也通过甲基化作用来结合,而巯基化合物被甲基化或葡萄糖醛酸化;胺类和肼类则被乙酰基化;这些反应防止由过氧化物酶催化的亲核物转变为自由基,以及酚、氨基酚、儿茶酚和氢醌生物转化为亲电性的醌和醌亚胺。消除巯基化合物和肼类的另一个途径是通过含黄素酶的单加氧酶类的氧化作用。某些醇类如乙醇经醇及醛脱氢酶氧化为羧酸而解毒。一种特殊的解毒机制是氰化物经硫氰酸酶生物转化而形成硫氰酸。

(3) 亲电物的解毒:亲电性毒物解毒的一般机制是与巯基亲核物谷胱甘肽结合。该反应可自发地发生,也可由谷胱甘肽 S-转移酶催化。金属离子如 Ag^{+}、Cd^{2+}、Hg^{2+} 和 CH_3Hg^{+} 离子易于与谷胱甘肽反应并通过谷胱甘肽解毒。亲电化学物解毒的特殊机制包括:环氧化物水化酶催化的环氧化物与芳烃氧化物分别生物转化为二醇类和二氢二醇类以及羧酸酯酶催化的有机磷酸酯杀虫剂的水解。另外一些机制包括:醌经 DT-黄递酶双电子还原为氢醌;α、β-不饱和醛由醇脱氢酶还原为醇,或由醛脱氢酶氧化为酸;具有巯基反应活性的金属离子由金属硫蛋白形成复合物;以及氧化还原活性的二价铁由铁蛋白形成复合物。亲电物与蛋白质的共价结合也可看做是解毒过程,倘若这种蛋白质不具有关键性的功能,同时不会成为一种新抗原或其他有害的方式,例如,羧酸酯酶不仅是通过水解使有机磷失活,而且也通过共价结合机制。

(4) 自由基的解毒:由于 $O_2^{-\cdot}$ 可转变为反应活性更高的化合物,故其消除是一种重要的解毒机制。这一转变是通过超氧化物歧化酶(SOD)定位于胞浆(Cu、Zn-SOD)和线粒体(Mn-SOD)的高效力酶来实施的。这些酶将 $O_2^{-\cdot}$ 转变为 HOOH。随后,HOOH 被胞质中含硒半胱氨酸的谷胱甘肽过氧化物酶或过氧化物酶体中的过氧化氢酶还原为水。没有一种酶能有效消除 $HO^{\cdot}$,虽然某些相对稳定的自由基如过氧自由基易于从谷胱甘肽、α-生育酚(维生素 E)或抗坏血酸(维生素 C)获得一个氢原子,因而变成非自由基,但这些抗氧化剂对于 $HO^{\cdot}$ 的解毒通常是无效的,这是由于 $HO^{\cdot}$ 的半衰期极短(10^{-9} s),几乎无法提供 $HO^{\cdot}$ 到达抗氧化剂并与之反应的时间。因此,对于 $HO^{\cdot}$ 的唯一有效的保护是通过排除其前体 HOOH(使其转变为水)来阻止它的形成。

$ONOO^{-}$ 不属于自由基氧化剂,明显比 $HO^{\cdot}$ 更稳定(半衰期约 1 s)。然而,小的生物抗氧化剂分子(谷胱甘肽、尿酸、抗坏血酸、α-生育酚)在终止其形成方面仍然是相对无效的。因为 $ONOO^{-}$ 易于与 CO_2 反应而形成具有反应活性的自由基。比较有效的是含有硒半胱氨酸的谷胱甘肽过氧化物酶,它能通过 HOOH 还原为水相同的方式将 $ONOO^{-}$ 还原为亚硝酸盐(ONO^{-})。含有 10 个硒半胱氨酸残基并覆盖在内皮细胞表面的硒蛋白也还原 $ONOO^{-}$,并可能作为血液中这种氧化剂的保护剂。此外,$ONOO^{-}$ 与氧合血红蛋白、含血红蛋白的过氧化物

酶和白蛋白反应，所有这些蛋白质可能都是 $ONOO^-$ 的消除场所。而且，两种 $ONOO^-$ 前体的清除[即通过与氧合血红蛋白反应（产生高铁血红蛋白和硝酸）清除 NO 以及通过 SOD 清除 $O_2^{-\cdot}$]是防止 $ONOO^-$ 增高的有效机制。过氧化物酶生成的自由基通过来自谷胱甘肽的电子转移来消除，这就导致谷胱甘肽的氧化，而谷胱甘肽的氧化可被 NADPH 依赖的谷胱甘肽还原酶所逆转。因此，谷胱甘肽在亲电物和自由基的解毒中起重要作用。

（5）蛋白质毒素的解毒：细胞外和细胞内的蛋白酶参与有毒多肽的失活作用。在蛇毒发现的几种毒素，如 α 和 β-银环蛇毒素、半环扁尾蛇毒素和磷脂酶含有它们活性所需的分子内二硫键。这些蛋白质可被硫氧还蛋白（thioredoxin，一种还原必需二硫键的内源性双巯基蛋白）所失活。

（6）解毒过程失效：解毒过程可因下述 4 种原因而失效：①解毒能力耗竭：毒物暴露剂量超过了机体解毒酶及底物合成水平，引起解毒酶耗竭，共底物（cosubstractes）的消耗或细胞抗氧化剂如谷胱甘肽、抗坏血酸和 α-生育酚的耗竭，导致终毒物的蓄积。②解毒酶失活：偶尔可见某种具有反应活性的毒物使解毒酶失活。例如，$ONOO^-$ 使 Mn-SOD 失效。这种酶在正常情况下可对抗 $ONOO^-$ 的形成。③某些结合反应可被逆转：例如，α-萘胺——一种膀胱致癌物在肝脏被 N-羟化并进行葡萄糖醛酸结合，以葡糖苷酸式排泄到尿中。而在膀胱中，葡糖苷酸被水解，释放的芳基羟胺经质子化过程和脱水过程转变为具有反应性的亲电子芳基硝鎓离子（arylnitronium）。异氰酸盐和异硫氰酸盐形成可被释放的不稳定的谷胱甘肽结合物。于是，甲基异氰酸盐酸在吸入后易于在肺部形成谷胱甘肽结合物，并由此处分布到其他组织，在这些组织中具有反应活性的亲电子母化合物可被再生。这样的结合物可看做毒物的转运形式。④有时解毒过程产生潜在的有害副产物：如谷胱甘肽自由基和谷胱甘肽二硫化物，它们在自由基解毒过程中产生。谷胱甘肽二硫化物能与蛋白质巯基形成混合二硫化物，而谷胱甘肽硫基自由基（$GS^\cdot$）在与硫醇盐（GS^-）反应后形成一种谷胱甘肽二硫化物自由基阴离子（$GSSG^{-\cdot}$），它能使 O_2 还原为 $O_2^{-\cdot}$。

二、终毒物与靶分子的反应

毒性是由终毒物与靶分子的反应所介导的，在不同生物学组织结构水平（如靶分子本身、细胞器、细胞、组织和器官，甚至整个机体）上引起的功能失常与结构损伤。终毒物与靶分子的交互作用触发毒性效应需考虑 3 个方面：①靶分子的属性；②终毒物与靶分子之间反应的类型；③毒物对靶分子的效应（图 3-2）。另外，必须考虑终毒物改变生物学微环境如关键内源分子、细胞器、细胞和器官的微环境（非终毒物与靶分子反应）所引起的毒性。

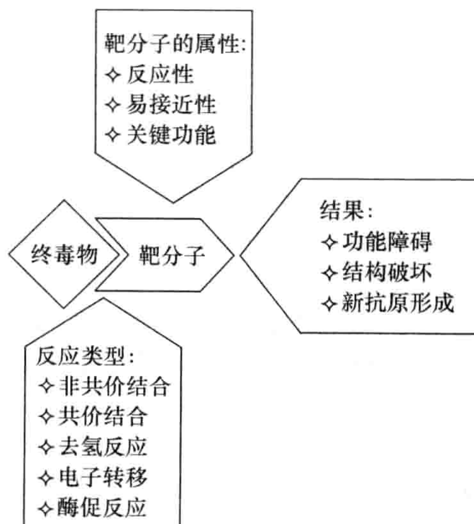


图 3-2　毒性发展的第二阶段：终毒物和靶分子的反应

（引自 Klaassen CD ed. *Casarett and Doull's Toxicology*. 7th ed. 2007）

1. *靶分子的属性*　实际上所有的内源化合物都是毒物潜在的靶分子，参与毒性的靶分子的鉴别及特征的认识构成一个主要的优先研究领域，但要获得一个潜在的靶分子的综合全面的清单是不可能的。毒理学最重要的靶标是大分子，如核酸（特别是 DNA）和蛋白质。在小分子中，膜脂质最为常

见，而辅因子如辅酶A和吡哆醛较少被涉及。

内源性分子作为一个靶分子必须具有合适的反应性和(或)空间构型，以容许终毒物发生共价或非共价反应。为了发生这些反应，靶分子必须接触足够高浓度的终毒物，因此，处于反应活性化学物邻近或接近它们形成部位的内源性分子常是靶分子。具有反应活性代谢物的第一个靶分子常常是催化这些代谢物形成的酶或邻近的细胞内结构，例如，负责甲状腺激素合成的酶——甲状腺过氧化物酶将某些亲核的外源化学物(如甲巯咪唑、杀虫强和间苯二酚)转变为活性自由基代谢物，这些自由基代谢物又使甲状腺过氧化物酶失活，这是这些化学物抗甲状腺作用以及诱发甲状腺肿瘤的基础。由细胞色素P450活化的四氯化碳破坏这种酶本身及其邻近的微粒体膜。几种线粒体酶(包括琥珀酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶和细胞色素C氧化酶)是肾毒性半胱氨酸结合物如二氯乙烯半胱氨酸的靶分子，因为这种结合物由线粒体半胱氨酸结合物β-裂合酶转变为亲电物。活性代谢物在密切靠近其形成部位没有合适内源性分子时，可能扩散直至它们遇到相关的反应物，例如，硬亲电物N-甲基-4-氨基偶氮苯在胞浆中产生的芳基硝鎓离子代谢物易于与核中的靶DNA反应。

并非所有化学物与靶分子的结合都发生有害效应。CO通过与亚铁血红蛋白结合而引起毒性，也可与细胞色素P450的铁结合而极少出现或不出现有害效应。毒物与细胞内各种蛋白质共价结合包括酶和结构蛋白的结合已经被证实，但哪一种蛋白质参与有毒理学意义的结合常常是不确定的。乙酰氨基酚引起的某些肝线粒体蛋白的芳基化与这种药物引发的肝损害可能具有因果相关，因为乙酰氨基酚的非肝毒性异构体与这些蛋白质不易发生共价结合。相反，由乙酰氨基酚引起的许多胞浆蛋白的芳基化可能是不重要的，因为这种药物的非肝毒性异构体也芳基化这些蛋白质。不出现不良后果的蛋白质共价结合甚至可能代表某种形式的解毒作用(通过占有毒理学相关的靶分子)。例如，有机磷杀虫剂共价结合与血浆丁酰胆碱酯酶是一种保护机制，因为它减少了靶分子乙酰胆碱酯酶的磷酰化。因此，为了最终确认引起毒性的靶分子，就必须证实：①终毒物与靶分子反应并对其功能产生不良影响；②终毒物在靶部位达到有效的浓度；③终毒物以某种机制与所观察的毒性相关的方式改变靶分子。

2. *反应的类型* 终毒物可能以非共价或共价的形式与靶分子结合，也可能通过去氢反应、电子转移或酶促反应而改变靶分子。

(1) 非共价结合(noncovalent binding)：这类结合可能是由于非极性交互作用或氢键与离子键的形成，具有代表性的是毒物与膜受体、细胞内受体、离子通道以及某些酶等靶分子的交互作用。例如，士的宁(番木鳖碱)结合与脊髓运动神经元上甘氨酸受体，TCDD结合与芳烃受体，哈蚌毒素结合钠通道，佛波酯结合与蛋白激酶C以及华法林(杀鼠灵)结合与维生素K2，3-环氧化物还原酶的原因，这种作用力也是吖啶黄和阿霉素插入双螺旋DNA的原因。由于这些化学物原子的空间排列使它们与内源性分子的互补部位结合，因而表现出毒性效应。非共价结合通常是可逆的，因为这种结合的键能相对较低。

(2) 共价结合(covalent binding)：共价结合实际上是不可逆的，由于这种结合持久地改变内源分子，因此具有重要的毒理学意义。共价加合物的形成常见于亲电毒物，如非离子和阳电子亲电物以及自由基阳离子。这些毒物与生物大分子如蛋白质和核酸中的亲核原子反应，亲电子剂对亲核原子表现出某些选择性，取决于其电荷/半径比。一般而言，软亲电物较易与软亲核物(两者均具有较低的电荷/半径比)反应，而硬亲电子较易与硬亲核物(两者均具有较高的电荷/半径比)反应。例如，银和汞这样的金属离子被归类为软亲电物，优先与软亲核物反应；而锂、钙和钡这样的硬亲电物优先与硬亲核物反应；在这两个极端之间的金属如铬、锌和铅

显示出与亲核物的普遍反应性。亲电物的反应性决定了哪种内源性亲核物能与之反应并成为其靶分子。

中性自由基如 HO˙、$NO_2^{\cdot}$ 和 $Cl_3C^{\cdot}$ 也能共价结合于生物分子。$Cl_3C^{\cdot}$ 加入到脂质的双键碳或脂质自由基产生含有氯甲基脂肪酸的脂质。HO˙ 加入到 DNA 碱基导致许多产物的形成，如 8-羟基脱氧鸟嘌呤、5-羟基甲基脱氧尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶乙二醇酯。

原则上亲核毒物倾向于与亲电内源化合物反应，但这样的反应不常发生，因为在生物分子中亲电物十分罕见。例如，胺类和肼类与一种脱羧酶的共底物醛吡哆醛的共价反应；一氧化碳、氰化物、硫化氢和叠氮化合物与各种血红素蛋白中的铁形成配位共价键。其他亲核物以电子转移反应的方式与血红蛋白反应。

(3) 去氢反应(hydrogen abstraction)：自由基迅速引起内源化学物去氢，生成新的内源性自由基。例如：巯基化合物(R-SH)去除氢形成硫基自由基(R-S˙)，这种自由基是其他巯基氧化产物如次磺酸(R-SOH)和二硫化物(R-S-S-R)的前身。自由基能从游离氨基酸或蛋白质氨基酸残基的 CH_2 基去氢，转变为羰基化合物，这些羰基化合物与胺类反应，形成与 DNA 或其他蛋白质的交联。从 DNA 分子中的脱氧核糖去除氢产生 C-4′自由基，这是 DNA 断裂的最初步骤。从脂肪酸去除氢产生脂质自由基并启动脂质过氧化。

(4) 电子转移(electron transfer)：化学物能将血红蛋白中的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+}，形成高铁血红蛋白血症。例如，亚硝酸盐能氧化血红蛋白，而 N-羟基芳胺(如氨苯砜羟胺)、酚类化合物(如 5-羟伯氨喹)和肼类(如苯肼)与氧合血红蛋白共氧化，形成高铁血红蛋白与过氧化氢。

(5) 酶促反应(enzymatic reaction)：少数毒素通过酶促反应作用于特定靶蛋白上。例如，蓖麻蛋白诱发核糖体的水解断裂，阻断蛋白质的合成。几种细菌毒素催化 ADP-核糖从 NAD^+ 转移到特定蛋白质。例如，白喉毒素阻断蛋白质合成过程中延伸因子的功能，霍乱毒素则活化一种 G 蛋白，蛇毒含有破坏生物分子的水解酶。

总之，大多数终毒物借助其化学反应性作用于内源性分子上，具有一种类型以上反应性的毒物可以通过不同机制与不同的靶分子反应。例如，醌类可以作为电子受体启动巯基氧化或导致脂质过氧化的自由基反应，但也可以作为软亲电物共价结合于蛋白质的巯基。

3. *毒物对靶分子的影响* 终毒物与内源性分子反应可引起功能与结构失常，而且对蛋白质而言，这种反应可使蛋白质变成免疫系统的外源异蛋白(即成为抗原)。

(1) 靶分子的功能失调：某些毒物模拟内源性配体，活化靶蛋白分子。例如，吗啡激活鸦片受体，氯贝丁酯为一种过氧化物酶体增殖物激活剂受体的激动剂；佛波酯和铅离子激活蛋白激酶 C。多数情况下，化学物抑制靶分子的功能。例如，阿托品、箭毒和番木鳖碱通过附着于配体结合部位或通过干扰离子通道的功能而阻断神经递质受体。河豚毒素和哈蚌毒素抑制神经元膜电压激活的钠通道开放；而 DDT 和除虫菊酯抑制钠通道的关闭；某些毒物阻断离子转运蛋白；另一些毒物抑制线粒体电子转移复合物或抑制酶的活性；结合于微管蛋白(如长春碱、秋水仙碱、紫杉醇、三价砷)或肌动蛋白(如细胞松弛素 β、次毒蕈环肽)的毒物损害细胞骨架蛋白的组装(聚合)和拆装(解聚)过程。

当蛋白质与毒物交互作用而改变其构型结构时，蛋白质的功能即受损害。例如，酪氨酸磷酸酶、甘油醛 3-磷酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶，Ca^{2+} 泵和转录因子 AP-1 等，受巯基反应化学物所损害，触发异常的信号转导和(或)损害细胞能量和代谢稳态。

毒物可干扰 DNA 的模板功能。化学物与 DNA 共价结合引起 DNA 复制过程核苷酸错配。例如，黄曲霉毒素 8，9-氧化物共价结合于鸟嘌呤的 N-7 位使得带有加合物的鸟嘌呤与

腺嘌呤配对而不是与胞嘧啶配对，导致不正确密码的形成及不正确的氨基酸插入蛋白质。例如，黄曲霉毒素诱发的 *ras* 原癌基因和 *P*53 肿瘤抑制基因突变。

(2) 靶分子的结构破坏

毒物通过与内源性分子形成加合物、发生交联和断裂而改变内源性分子的一级结构。双功能的亲电物如 2, 5-己二酮、二硫化碳、丙烯醛、4-羟壬醛和氮芥烷化剂能交联细胞骨架蛋白、DNA、或使 DNA 与蛋白质交联。羟基自由基通过使上述大分子转变为活性亲电物(如蛋白羰基)或自由基也引起交联。交联使被联结的分子发生结构与功能障碍。

某些靶分子受化学物攻击后自发性降解。自由基如 $Cl_3COO^{\cdot}$ 和 $HO^{\cdot}$ 可引起脂肪酸脱氢而启动脂质的过氧化降解，所形成的脂质自由基($L^{\cdot}$)通过氧固化作用转变为脂质过氧自由基($LOO^{\cdot}$)；并通过去氢反应形成脂质氢过氧化物(LOOH)，通过 Fe(Ⅱ)催化的 Fenton 反应形成脂质烷氧自由基($LO^{\cdot}$)，随后的断裂引起烃(如乙烷)以及活性醛(如 4-羟壬醛和丙二醛)的形成。因此，脂质过氧化不仅破坏细胞膜脂质，而且还容易与邻近的分子如膜蛋白质反应，或扩散至核与 DNA 反应。

毒物可引起几种形式的 DNA 断裂。例如，DNA 碱基受 $HO^{\cdot}$ 自由基攻击可形成咪唑环开放的嘌呤或环收缩的嘧啶，可阻断 DNA 复制。在鸟嘌呤 N-7 位形成大分子加合物使 N-糖苷链不稳定，诱发脱嘌呤作用，导致具有致突变作用的无嘌呤部位的形成；羟自由基通过从 DNA 的核糖获得 H、产生 C-4′自由基、随后发生 $O_2^{-\cdot}$ 加成、Criegee 重排和磷酸二酯链的断裂而引起 DNA 单链断裂；电离辐射后，多种羟自由基攻击长度较短的 DNA 引起双链断裂，最终导致细胞死亡。

(3) 新抗原形成：尽管外源化学物或其代谢物与生物大分子的共价结合对机体免疫系统并不产生严重后果，但在某些个体，发生结构变化的蛋白质常作为新抗原，激发机体的免疫应答。某些化学物(如硝基氯苯、青霉素、镍)可能具有足够高的反应性而自发地结合于蛋白质。另外一些化学物可通过自氧化为醌类或通过酶促生物转化而获得反应性。例如，细胞色素 P450 将氟烷生物转化为三氟乙酰氯，作为半抗原而结合于肝脏各种微粒体和细胞表面蛋白质，诱导抗体产生，免疫反应引起肝炎样综合征。药物引起的狼疮、可能还有许多药物引起的粒性白细胞缺乏症是由药物-蛋白质加合物触发的免疫反应所介导的。导致此类反应的化学物通常都是亲核物，如氨基比林、氯氮平、普鲁卡因胺和异烟肼等芳香胺类以及丙硫氧嘧啶、甲巯咪唑和卡托普利等巯基化合物。某些带有加合物的蛋白质能模拟正常蛋白质，因此正常蛋白质也能受抗体攻击。

4. 非经靶分子反应引起的毒性　某些外源化学物不是通过或不完全通过与特定内源性靶分子交互作用而引起毒性，而是通过改变生物学微环境而导致毒性，包括：①能改变生物水相中的 H^+ 离子浓度的化学物，如酸和能生物转化为酸的物质(如甲醇和乙二醇)以及疏质子解耦联剂(如 2, 4-二硝基酚和五氯酚)，它们在线粒体基质中使酚的质子分离，因而使推动 ATP 合成的质子梯度消失；②使细胞膜脂质相发生物理化学改变以及破坏细胞功能所必需的穿膜溶质梯度的溶剂及去垢剂；③仅通过占据位置或空间引起危害的其他外源化学物，如某些化学物(如乙二醇)在肾小管中形成水不溶性沉淀物；磺胺类化合物通过占据白蛋白的胆红素结合位点而引起新生儿胆红素毒性(核黄疸 kernicterus)；CO_2 取代肺泡腔的氧而引起窒息。

三、细胞调节功能障碍

毒物与靶分子反应可导致细胞功能损害，是毒性发展过程的第 3 个阶段(图 3-3)。多细

胞机体的每个细胞都执行着特定的程序，某些程序决定细胞的命运：增殖、分化或凋亡。而另一些程序则控制已分化细胞的瞬息活动[ongoing (momentsry) activity]，决定细胞分泌物质的数量、是否收缩或舒张、转运和代谢营养物质的速率。为调节这些细胞程序，细胞具有能被外部信号分子激活或失活的信号网络。为执行这些程序，细胞装备有合成、代谢、动力、转运和产生能量的体系以及结构元件，组装为大分子复合物、细胞膜和细胞器，借此以维持其自身的完整性（内部功能）和支持其他细胞的维护（外部功能）。

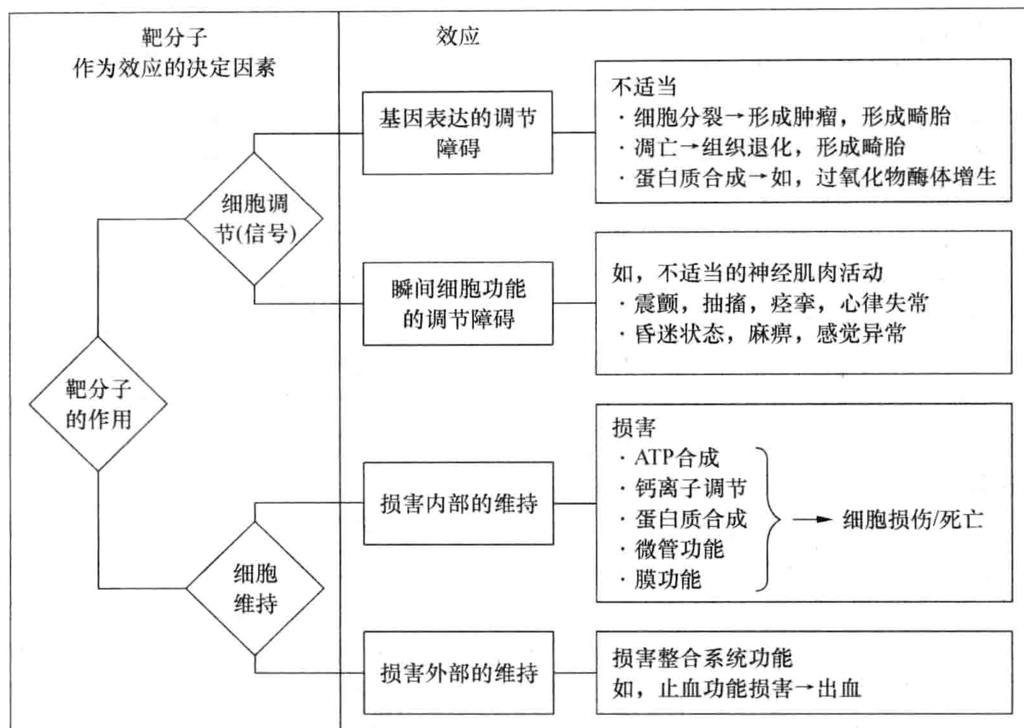


图 3-3　毒性发展的第三阶段：细胞调节或维持功能的改变

（引自 Klaassen CD ed. *Casarett and Doull's Toxicology*. 7th ed. 2007）

毒物所引起的最初细胞功能障碍（但不一定是最终的结果）主要取决于受影响靶分子的功能。如果受影响的靶分子参与细胞信号通路的调节过程，那么基因表达的调节障碍和（或）细胞瞬息活动调节障碍就会首先发生；如果受影响的靶分子主要参与维持细胞自身的功能，则可能威胁到细胞的存活；毒物与行使外部功能的靶分子反应可能影响其他细胞和整个器官系统的功能。

（一）毒物引起的细胞调节障碍

细胞受信号分子所调节，信号分子激活与信号转导网络所联系的细胞受体，而信号转导网络将信号传递给基因的调节区域和（或）功能蛋白质。受体激活最终可导致：①改变基因的表达，增加或减少特定蛋白质的功能；②通过磷酸化使特定蛋白发生化学修饰，从而激活或抑制蛋白质。控制细胞命运的程序主要影响基因表达，而调节日常活动的程序主要影响功能蛋白质的活性；由于信号网络的分支和交互联系，一个信号常常触发两类应答。

1. 基因表达调节障碍　毒物可通过直接作用于顺式作用元件，也可通过作用于细胞内信

号转导通路分子或影响细胞外信号分子的合成、贮存或释放过程，最终导致基因表达调控障碍。

(1) 基因转录调节障碍：遗传信息从 DNA 转录给 mRNA 主要受转录因子(TF)与基因的调节或启动区域间的相互作用所控制。通过与这一区域的核苷酸序列相结合，激活的转录因子促进前起始复合物(preinitiation complex)的形成，促使相毗邻的基因的转录。外源化学物可与基因的启动子区域、转录因子或前起始复合物的其他元件交互作用，然而，转录因子激活作用的改变似乎是最常见的方式。从功能角度看，已知有两种类型的 TF：配体激活的 TF 和信号激活的 TF。

许多天然化合物如激素(类固醇、甲状腺激素)和维生素(视黄醇和维生素 D)通过激活转录因子而影响下游靶基因的表达。有些外源化学物可模拟天然配体而调节基因表达，例如，祛脂酸类降血脂药和邻苯二甲酸酯模拟多不饱和脂肪酸作为过氧化物酶体增殖剂激活性受体(PPAR)的配体，而 Cd^{2+} 替代 Zn^{2+}——金属应答元件结合的转录因子(MTF-1)的内源性配体。天然或外源化学物配体在以极端剂量摄入或在个体发生的关键期摄入时，可通过配体激活的 TF 而引起毒性。糖皮质醇与糖皮质激素受体(GR)结合可引起淋巴细胞的凋亡。TCDD 活化 Ah 受体(AHR)导致胸腺萎缩、消耗性综合征、致畸作用(腭裂)、诱导细胞色素 P450 和多种外源化学物代谢酶的基因表达。雌激素在表达雌激素受体的细胞(如雌性生殖器官、乳腺和肝脏中所见到的细胞)可引起致有丝分裂的作用。在雌激素长期暴露时，由雌激素诱导的增殖似乎是这些器官肿瘤形成的原因。作用于配体激活的 TF 的化学物，如糖皮质醇、TCDD 和视黄醇诱发胚胎畸形，可看做不合适的基因表达。

(2) 信号转导调节障碍：细胞外信号分子，如生长因子、细胞因子、激素和神经递质最终能通过细胞表面受体和细胞内信号转导网络激活 TF，调控影响细胞周期进展和决定细胞结局的基因。在这些 TF 中，有 c-Fos 和 c-Jun 蛋白，它们以二聚体的形式(称之为 AP-1)结合到十四烷酰佛波醇乙酸酯(TPA)应答元件(TRE)，如细胞周期蛋白 *D* 基因启动子中的 TRE。另一个是 c-Myc 蛋白，当它与 Max 蛋白二聚体并结合于其同源的核苷酸序列时，能激活细胞周期蛋白 *D* 和 *E* 基因，接着细胞周期蛋白通过活化细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶而加速细胞分裂周期。因此，促有丝分裂的信号分子诱导细胞增殖；相反，TGF-β 诱导细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶抑制蛋白(如 P27)的表达，这种蛋白质介导着抗有丝分裂作用。

从细胞表面受体到 TF 的信号通过连续的蛋白质-蛋白质交互作用和蛋白质磷酸化而分段传递。暴露于所有细胞表面的生长因子受体实际上是起磷酸化作用的酶(即受体蛋白酪氨酸激酶)。配体诱导相应受体自我磷酸化，磷酸化的受体能结合于连接物蛋白(adapter protein)，并通过这些连接物蛋白激活 Ras，活化的 Ras 建立了有丝分裂原激活的激酶(MAPK)级联反应，涉及一系列蛋白激酶的磷酸化，最终到达 TF。因此，从受体经激酶再到转录因子的许多信号元件的活性受特定丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸羟基磷酸化的影响。这些信号转导蛋白一般通过蛋白激酶催化的磷酸化来激活，同时通常是通过由蛋白磷酸酶执行的脱磷酸化反应来使之失活。

化学物可通过多种途径引起信号转导障碍，最常见的是通过改变蛋白磷酸化，偶尔也通过干扰 G 蛋白(如 Ras)的 GTP 酶活性、破坏正常的蛋白质-蛋白质交互作用、或通过建立异常的交互作用、或改变信号蛋白的合成与降解。这样的干预最终可影响细胞周期的进展。

细胞内还存在一些能使信号保持在受控下的抑制性结合蛋白，如胞浆中 IKB 与 NF-KB 结合，防止 NF-KB 转移到核内并发挥 TF 功能。在磷酸化时，IKB 被降解，使得 NF-KB 变

为游离的。由于IKB的磷酸化能被一种MAPK级联反应的蛋白激酶Raf所催化，也由于释放出来的NF-KB能反式激活c-Myc基因，因此，NF-KB也可促使所调控几种细胞因子(如TNF-α，IL-1β)和急性期蛋白质(如c-反应蛋白，α1-酶性糖蛋白)的基因转录。因此，NF-KB在炎症和急性期反应中起一种引导作用。IKB降解和NF-KB活化也能由氧化应激所诱导，过氧化物似乎是介导这种作用的活性氧。活化的NF-KB可能引起对氧化应激的增生和炎症反应。NF-KB也可通过维持c-Myc转录和反式活化抗凋亡的IAP蛋白的基因(抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶)而防止细胞凋亡的发生。

(3) 细胞外信号产生的调节障碍：脑垂体前叶激素通过作用于细胞表面受体，促进外周内分泌腺细胞有丝分裂并调控外周腺体激素的分泌；外周腺体激素负反馈调控脑垂体激素的产生。雌激素通过促性腺激素分泌的反馈抑制而引起睾丸萎缩，外源性雌激素氯酮(chlordecone)通过促性腺激素分泌的反馈抑制引起工人精子数降低。除草剂amitrole抑制甲状腺激素分泌、苯巴比妥促进甲状腺激素代谢，继而降低甲状腺激素水平，通过反馈调控增加垂体促甲状腺激素(TSH)的分泌，过量TSH刺激甲状腺细胞的分裂，导致甲状腺肿或甲状腺肿瘤的发生。

2. *细胞瞬息活动的调节障碍*　特定细胞正常运行的控制是通过作用于膜受体的信号分子来实施的，这些受体通过调节Ca^{2+}进入胞质或刺激细胞内第二信使的酶促反应传递信号。Ca^{2+}或其他第二信使最终改变功能蛋白质的磷酸化或去磷酸化并改变其活性，引起细胞功能的变化。毒物可通过干扰信号转导过程中的任何一个步骤而影响细胞的瞬息活动。

(1) 可兴奋细胞的调节障碍：许多外源化学物影响神经元、骨骼肌、心肌和平滑肌等可兴奋细胞的活动，这些细胞的功能如神经递质的释放、肌肉的收缩受邻近神经元合成和释放的递质或介质的控制。

许多药物通过调节神经和肌肉活动发挥其药理作用，而过量的药物、杀虫剂以及微生物、植物和动物毒素则通过该机制对机体产生毒效应。神经元是信号转换细胞，化学物作用于神经元不仅对神经元本身造成损伤，也可影响下游细胞的正常生理功能。例如，阻断运动神经元电压门控的Na^{+}通道的河豚毒素可引起骨骼肌麻痹；相反，阻断中枢神经系统GABA受体的环二烯杀虫剂诱发神经兴奋和惊厥。

外源化学物引起的瞬息细胞活动的障碍可能是由于下述4方面的改变：①神经递质浓度；②受体功能；③细胞内信号转导；④信号终止。

(2) 其他细胞活动的调节障碍：很多信号转导机制也在非可兴奋细胞中起作用，但这些细胞信号转导过程的失调通常不产生严重的后果。例如，大鼠肝细胞表达α1-肾上腺素能受体，受体的激活可引起葡萄糖水解和谷胱甘肽输出的增加，这些改变可能对细胞有一定毒理学意义。

许多外分泌细胞受毒蕈碱样乙酰胆碱受体调控。有机磷杀虫剂中毒后唾液分泌、流泪和支气管过度分泌就是由于乙酰胆碱受体的刺激；相反，这些受体的阻断导致阿托品中毒时的高热。饮用乙醇可引起血液中细菌内毒素水平迅速升高，细菌内毒素通过激活肝脏库普弗细胞(Kupffer)表面的Toll样受体4(TLR4)、启动Toll样受体信号通路并产生大量炎性细胞因子和活性氧(ROS)，引起邻近肝实质细胞的毒性损伤。库普弗细胞具有甘氨酸受体(即甘氨酸门控的Cl^{-}通道)，摄入甘氨酸(通过Cl^{-}内流诱导超极化)可阻断库普弗细胞分泌炎症介质，这种干预作用缓解了乙醇引起的肝损害。

某些磺胺药引起实验动物低血糖的发现导致了糖尿病患者口服血糖药的开发。这些药物

抑制胰腺β细胞的K^+通道，诱导去极化，引起Ca^{2+}通过电压门控的Ca^{2+}通道内流和胰岛素的外排。抗高血压药二氮嗪以相反的方式作用于K^+通道，抑制胰岛素的分泌，这种药物可开发应用于无法手术治疗的胰岛素分泌型胰腺肿瘤的治疗。

（二）毒物引起细胞维持功能改变

许多毒物干扰细胞维持功能，在多细胞机体，细胞必须维持其本身的结构与功能完整性，并对其他细胞提供支持功能。这些功能的执行可被化学物所破坏，导致毒性反应。

1. 细胞内部维持损害　所有细胞为了生存必须合成内源性分子，组装大分子复合物、细胞膜及细胞器，以维持细胞内环境，并产生细胞活动所需的能量。破坏这些功能的毒物，特别是损害线粒体能量产生功能和控制基因组功能蛋白合成的毒物均可危及生存并可引起细胞毒性和细胞死亡。使细胞遭受致死性打击的外源化学物可启动3种关键性的生化紊乱引起细胞致死性损伤，即ATP耗竭、持续性的细胞内Ca^{2+}升高以及ROS和RNS过量产生。

（1）细胞内部维持损害机制

1）ATP耗竭：ATP作为生物合成的化学物质和能量的主要来源在细胞维持中起核心作用。ATP用于许多生物合成反应、通过磷酸化和腺苷化作用活化内源化合物，掺入到辅因子及核酸中去。它对肌肉收缩和细胞骨架的聚合作用、细胞运动、细胞分裂、囊泡转运提供能量和维持细胞形态都是必不可少的。ATP驱动离子转运蛋白，如质膜的钠钾ATP酶、质膜和内质网膜的钙ATP酶、溶酶体膜以及含神经递质的囊泡的H^+-ATP酶。这些泵维持了各种细胞功能所必需的条件，例如，由Na^+，K^+泵形成的穿质膜Na^+浓度梯度驱动Na^+-葡萄糖和Na^+-氨基酸协同转运蛋白以及Na^+/Ca^{2+}反向转运蛋白，促使这些营养素的进入和Ca^{2+}移动。

化学能通过ATP水解为ADP或AMP的形式来释放。ADP在线粒体中由ATP合酶重新磷酸化。与氢氧化为水相耦联，这一过程称为氧化磷酸化。除了ATP合酶，氧化磷酸化还需要：①氢以NADH的形式传递给初始电子转运复合物；②氧传递给终末电子转运复合物；③ADP和无机磷转运给ATP合酶；④电子沿电子传递链流向O_2，伴有质子从基质腔穿内膜逐出；⑤质子沿电化学梯度下穿越内膜返回到基质腔从而驱动ATP合酶。

干扰线粒体ATP合成的化学物分为5类：①A类化学物干扰氢向电子传递链传递，如氟乙酸抑制柠檬酸循环和还原性辅因子的产生。②B类化学物如鱼藤酮和氰化物抑制电子沿电子传递链转移到分子氧。③C类化学物干扰氧传递到终末电子转运蛋白——细胞色素氧化酶。④D类化学物抑制ATP合酶(氧化磷酸化的关键酶)的活性。抑制ATP合酶有以下4种方式：直接抑制ATP合酶；干扰ADP的传递；干扰无机磷的传递；剥夺ATP合酶的驱动力——受控的质子向基质间腔内流的力量。疏质子化学物(解耦联剂)如2，4-二硝基酚和五氯酚将质子输入到线粒体基质，使驱动质子受控流入基质(随后驱动ATP合酶)的质子梯度消散。⑤E类化学物引起线粒体DNA损害，因而损害由线粒体基因组编码的特定蛋白质(如复合物Ⅰ亚单位和ATP合酶)合成，包括用于抗AIDS的双脱氧核苷类药物如齐多夫定(叠氮胸苷)。

氧化磷酸化的损伤对细胞是有害的，因为ADP未能重新磷酸化导致ADP及其代谢产物的堆积以及ATP的耗竭。腺苷二磷酸盐和三磷酸盐(以Mg盐形式存在)的水解以及磷酸和Mg^{2+}的释放，暴露于KCN和碘乙酸的肝细胞胞质H^+和Mg^{2+}迅速升高。丙酮酸转变为乳酸增加也可能引起酸中毒。ATP的缺乏危及需ATP的离子泵的功能，导致离子及细胞容量调节控制的丧失。细胞内的酸中毒及高镁症后不久，暴露于KCN和碘乙酸的肝细胞即出现细

胞 Na^+ 的升高，可能是由于 Na^+ 泵的失效，随后质膜出现大疱状结构。细胞内磷酸症是有益的，可能是由于释放的磷酸形成不溶性的磷酸钙，防止胞质 Ca^{2+} 的升高。此外，低 pH 也直接降低了磷脂酶的活性，抑制线粒体渗透转移。最终，细胞内 pH 升高，酸酯酶活性增加，通过磷脂的降解和内源性去垢剂（如溶血磷脂和游离脂肪酸）的生成，最终导致不可逆的膜损伤。由于溶血性磷脂与脂肪酸的再酰化过程受损，ATP 的缺乏加剧了这种变化。

2）细胞内 Ca^{2+} 的持续升高：细胞内 Ca^{2+} 水平是受到严格调控的。细胞外和胞质 Ca^{2+} 浓度之间所存在的 10 000 倍差异是通过质膜对 Ca^{2+} 的不通透和 Ca^{2+} 从胞质清除的转运机制来维持，Ca^{2+} 从胞质穿过质膜被主动泵出，并隔离在内质网和线粒体里。由于线粒体配备的转运蛋白亲和力低，故仅当胞质 Ca^{2+} 水平升高到微克分子浓度范围时，线粒体才在 Ca^{2+} 隔离中起有意义的作用。此时，大量 Ca^{2+} 蓄积于线粒体中，以磷酸钙形式沉积。

毒物通过促进 Ca^{2+} 向细胞质内流或抑制 Ca^{2+} 从细胞质外流而诱导胞质 Ca^{2+} 水平的升高。配体或电压门控的 Ca^{2+} 通道开放或质膜损伤引起细胞外液与细胞质之间 Ca^{2+} 浓度梯度的降低。毒物也可诱导 Ca^{2+} 从线粒体或内质网漏出而增加胞质 Ca^{2+}，也可通过抑制 Ca^{2+} 转运蛋白或耗竭其驱动力而减少的 Ca^{2+} 的外流。细胞内 Ca^{2+} 的持续升高是有害的，能导致：①能量储备的耗竭；②微丝功能障碍；③水解酶的活化；④ROS 和 RNS 的生成。

3）ROS 与 RNS 的过度产生：有许多外源化学物可直接生成 ROS 与 RNS，如氧化还原循环物质和过渡金属。此外，ROS 和 RNS 的过度产生可继发于细胞内高钙，因为 Ca^{2+} 以下述方式激活生成 ROS 和 RNS 的酶：①Ca^{2+} 活化三羧酸循环中的脱氢酶加速氢的产生和电子沿电子传递链的流动，这一过程与 ATP 合酶活性的抑制共同增加由线粒体电子传递链形成的 $O_2^{-\cdot}$；②Ca^{2+} 激活的蛋白酶通过蛋白质水解过程使黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶，其副产品为 $O_2^{-\cdot}$ 和 HOOH；③神经元和内皮细胞组成型表达 Ca^{2+} 激活的 NOS。由于 $NO^{\cdot}$ 与 $O_2^{-\cdot}$ 具有极高的活性，这两种自由基反应生成毒性更强的 $ONOO^-$。而且，$ONOO^-$ 可通过使高敏感性的 Mn－SOD（可清除 $ONOO^-$ 的前身 $O_2^{-\cdot}$）失效而进一步增加 $ONOO^-$ 的生成。

（2）细胞内部维持损害机制之间的相互关系：细胞生化过程的原发性紊乱不是孤立的，而是以多种方式相互作用、彼此放大：①细胞 ATP 储存的耗竭使内质网质膜 Ca^{2+} 泵的燃料丧失，引起胞质 Ca^{2+} 的升高。随着 Ca^{2+} 内流进线粒体，$\Delta\psi m$ 下降，ATP 合酶发生障碍。②细胞内高钙促进 ROS 和 RNS 的形成，而 ROS 与 RNS 使巯基依赖的 Ca^{2+} 泵发生氧化性失活，反过来又加剧了高钙。③ROS 与 RNS 也能消耗 ATP 储备，NO 是一种细胞色素氧化酶的可逆性抑制剂。NO^+（亚硝基鎓阳离子，一种 NO 的产物）使甘油醛－3－磷酸脱氢酶发生 S－亚硝酰化并使之失活，影响糖酵解作用，而 $ONOO^-$（与酶的 Fe－S 中心反应）使呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和顺乌头酸酶发生不可逆的失活。因此，NO 和 $ONOO^-$ 抑制细胞 ATP 合成。④$ONOO^-$ 能诱发 DNA 单链断裂，导致聚（ADP－核糖）聚合酶（PARP）激活。作为修复机制的一部分，激活了的 PARP 将来自 NAD^+ 的多个 ADP－核糖部分转移到核蛋白和 PARP 本身，NAD^+ 的消耗严重地危及 ATP 合成，而 NAD^+ 的再合成又消耗 ATP，因此由 $ONOO^-$ 引起的 DNA 损害的主要后果是细胞能量不足。

有些引起细胞功能紊乱的连锁反应及其引起的代谢状况恶化是某些细胞特有的。例如，氰化物诱发神经元去极化和谷氨酸释放，导致 Ca^{2+} 经电压门控及谷氨酸门控的 Ca^{2+} 通道内流，最终引起神经元毒性。神经元在表达 Ca^{2+} 激活的 NOS 时，也易于产生"亚硝化应激"，这种应激不仅影响神经元本身，可能更重要的是影响邻近的星形胶质细胞。相反，在氰化物和碘乙酸中毒的肝细胞，胞质 Ca^{2+} 增加不是早期事件，NO 形成极少可能参与。然而，ATP 耗竭，

细胞内高钙和 ROS 及 RNS 过度产生有交互影响，涉及多步恶性循环，可能进行性地加剧生化紊乱，直至这种紊乱最终引起细胞死亡。

（3）细胞内部维持损害的后果

1）坏死(necrosis)：线粒体 Ca^{2+} 摄取、$\Delta\psi m$ 下降、ROS 和 RNS 生成、ATP 耗竭和原发性代谢紊乱（如无机磷、游离脂肪酸和溶血磷脂的蓄积）均被认为是引起线粒体内膜通透性（称之为 MPT）突然升高的因素。MTP 是由一种跨越线粒体内外膜间的蛋白质孔（“巨通道”）开放而引起的。由于此孔对相对分子质量 1 500 的溶质是可通透的。因此，它的开放使质子自由地内流进基质间隙，引起的 $\Delta\psi m$ 迅速和完全耗散、ATP 合成的中断以及水的渗透内流，导致线粒体膨胀，已蓄积于基质间隙的 Ca^{2+} 通过此孔流出，进入胞质。这样的线粒体不仅不能合成 ATP，而且由于内膜的去极化迫使 ATP 合酶以相反的模式（即作为一种 ATPase 水解 ATP）起作用，从而浪费余留的 ATP。然后，甚至糖酵解也因需 ATP 的糖酵解酶（己糖激酶，磷酸果糖激酶）ATP 供应不足而被危及。假如毒物引起的代谢紊乱十分广泛以至于大部分或全部的线粒体都发生 MPT，引起细胞 ATP 耗竭时，细胞降解过程（如大分子和膜的氧化性和水解性降解以及细胞内溶质和容积稳态的崩解）将引起细胞结构和功能维持完全丧失，细胞溶解或坏死达到顶峰。

2）凋亡(apoptclsis)：对细胞能量代谢，Ca^{2+} 稳态和氧化还原状态造成不良影响并最终引起坏死的化学物也可诱发另一种形式的死亡——凋亡。坏死细胞出现肿胀与溶解，而凋亡细胞则出现皱缩、核和胞质物质浓缩并形成凋亡小体。一个细胞在其通往死亡的道路上所经历的多种代谢缺陷是互为因果的，但在次序上却是相当随机的。与之相反，凋亡过程却是有序的，牵涉到的分解代谢过程的级联样激活，最终引起细胞凋亡的机制主要有 3 种途径：线粒体途径、死亡受体途径和内质网应激途径。

大多数化学物诱发的细胞死亡涉及线粒体，导致线粒体功能失调（如 Ca^{2+} 的蓄积，$\Delta\psi m$ 的耗散、ROS/RNS 的过量产生），最终触发坏死或凋亡。同时，MPT 是这两个过程的关键事件。另一个相关事件是细胞色素 c(Cyt c)进入胞质。Cyt c 释放的意义有两个方面：①由于 Cyt c 处于线粒体电子传递链，Cyt c 丢失将阻断 ATP 合成，增加的 $O_2^{-\cdot}$ 形成，促使细胞死亡；②释放的 Cyt c 启动凋亡途径。当 Cyt c 与 ATP 一起结合于一种连接物蛋白（Apaf - 1）时，Cyt c 能诱发 Apaf - 1 结合的休眠状态半胱天冬酶原- 9(procaspase - 9)发生蛋白质水解断裂而成为有活性的半胱天冬酶- 9(caspase - 9)。

半胱天冬酶(caspases)是一类能在特定的天门冬氨酸残基裂解蛋白质的半胱氨酸蛋白酶（即具有催化活性的半胱氨酸），以无活性的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶原存在于胞质中，该酶原经蛋白质水解转变为活性蛋白酶。某些 caspases（如 2、8 和 9）断裂和激活 procaspases，借此这些信号型 caspases 传递活化的信号至效应器 caspases，后者修剪特定的细胞蛋白，使蛋白活化或失活。正是 caspase 催化的这些特定蛋白的水解，直接或间接地解释了凋亡细胞的形态学和生物化学改变。

决定细胞死亡的线粒体事件 MPT 和 Cyt c 释放受 *Bcl* - 2 家族的蛋白质控制，*Bcl* - 2 基因家族包括促进凋亡基因（如 *Bax*、*Bad*、*Bid*）和抑制凋亡基因（如 *Bcl* - 2、*Bcl* - *xL*）。促进死亡的成员可能直接作用于线粒体膜，而它们的抑制死亡对应物被认为主要是通过与死亡激动剂二聚作用，因而使之中性化。因此，相当数量的这些拮抗性蛋白质作为细胞存活与死亡之间的调节开关而发挥其功能。

促凋亡的 *Bax* 和 *Bid* 蛋白质也代表线粒体外启动的死亡程序，以保证线粒体进入凋亡过

程的环节。电离辐射和 UV 辐射、烷化剂、阿霉素和拓扑异构酶Ⅱ抑制剂引起 DNA 损伤，诱导 p53 蛋白的稳定与激活，继而诱导 *Bax* 蛋白表达。由于 DNA 损伤可能引起突变和致癌作用，因此 DNA 损伤细胞的凋亡是机体对抗肿瘤发生的重要自我防御。TNF 受体-1 或 Fas 刺激能直接活化 caspase 启动细胞凋亡，Fas 也能通过 caspase 介导的 *Bid* 活化使线粒体进入死亡程序。Fas 系统参与细胞介导的细胞毒性。细胞毒 T 淋巴细胞表达 Fas 配体，激活肝脏、心脏和肺细胞膜中 Fas。单-(2-乙基-己基)邻苯二甲酸盐或 2，5-己二酮通过作用于 Fas 诱导啮齿类动物睾丸精细胞凋亡。这些化学物损害正常维护精细胞的 Sertoli 细胞(支持细胞)的微管。支持细胞未能支持精细胞时，就过度表达 Fas 配体(经凋亡而耗竭精细胞)以限制精细胞的数量(这些细胞上调其 Fas 受体)。

因此，细胞凋亡可经多个途径进行，这些途径均涉及 caspase 活化。不同途径的先后顺序主要取决于最初的损伤以及细胞的类型和状态。例如，缺乏 *bax* 基因的 T 淋巴细胞在对电离辐射应答时仍然能发生 P53 依赖的死亡，可能是通过增加 Fas 表达，而缺失 *Bax* 的成纤维细胞则不能通过这一通路启动细胞凋亡。

(4) ATP 的利用度决定细胞死亡的形式：毒物在低暴露水平或高暴露水平后的早期阶段倾向于诱发凋亡，而在高暴露水平后则引起坏死。例如，肝毒物乙酰氨基酚、1，1-二氯乙烯、硫代乙酰胺和镉以及肾毒物赭曲霉毒素既引起凋亡，也引起坏死。此外，由细胞毒物引起的两种形式的细胞死亡就可能涉及类似的代谢紊乱，其中最重要的是 MPT。MPT 的阻断剂(如环孢霉素 A、*Bcl*-2 过度表达)既阻止凋亡，也阻止坏死的发生。

决定细胞死亡形式的关键是 ATP 的利用度。在诸如 Ca^{2+}-暴露的肝细胞、Fas 刺激的 T 淋巴细胞和 HOOH 暴露的内皮细胞这样不同的实验模型中，当细胞耗竭 ATP 时出现坏死而不是凋亡，但当提供 ATP 生成的基质而使 ATP 耗竭得以缓解时，则发生凋亡。

发生 MPT 的线粒体的数量(这也是取决于化学物暴露的程度)决定了细胞 ATP 耗竭的严重性以及随后的细胞结局。当仅有极少数线粒体发生 MPT 时，这些线粒体以及伴随它们的促凋亡信号(如 Cyt c 外流)通过溶酶体自吞噬而清除，细胞存活。当 MPT 涉及更多线粒体时，自吞噬机制被抑制，释放的 Cyt c 启动 caspase 活化，细胞凋亡发生。当 MPT 实际上涉及所有的线粒体时，ATP 被严重耗竭，阻止了需 ATP 步骤参与的凋亡程序，细胞倾向于坏死。

(5) 由未知机制诱发的细胞死亡：通过其他机制引起细胞死亡的毒物包括：①直接损害质膜的化学物，如脂质溶剂、去污剂和来自蛇毒的水解酶；②损害溶酶体膜的外源化学物，如氨基糖苷抗生素和结合于 $\alpha_{2\mu}$-球蛋白的烃类；③破坏细胞骨架的毒素，如微丝毒素鬼笔环肽和细胞松弛素以及微管毒素秋水仙碱和 2，5-己二酮；④蛋白磷酸酶抑制剂肝毒素微囊藻素，它们引起微丝和其他细胞蛋白超磷酸化；⑤破坏细胞蛋白质合成的毒素，如 α-鹅膏蕈碱和蓖麻蛋白。暴露于上述化学物后导致细胞死亡的事件通常是未知的，可能最终是由氧化磷酸化的损害、细胞内 Ca^{2+} 的持续升高和(或)ROS/RNS 过度产生所介导。

2. 细胞外部维持的损害　毒物也能干扰那些给其他细胞组织或整个机体提供支持的细胞。作用于肝脏的毒物就是这类毒性的一个实例。肝细胞产生并释放许多蛋白质和营养素进入循环中，从循环中清除胆固醇和胆红素，将它们分别转化为胆汁酸和胆红素葡萄糖醛酸酯，这些过程的中断可能对机体、肝脏或对两者均是有害的。例如，由香豆素引起的肝脏凝血因子合成抑制并不损害肝脏，但可因出血而引起死亡，这是华法林(杀鼠灵)灭鼠作用的机制。在禁食状态，肝葡萄糖异生作用抑制剂如降糖氨因其限制脑的葡萄糖供应可能具有致死作用。同样的，Reye 综合征被认为是因病毒性疾病(可诱导肝 NOS)和水杨酸(可激发 MPT)摄取的联

合作用引起的肝线粒体损伤。这种综合征不仅引起肝细胞损害，而且也引起影响其他器官的严重代谢紊乱(低血糖和高血氨)。对脂肪酸β-氧化或合成、组装和脂蛋白分泌的化学性干扰使肝脏脂质过度负荷，引起肝功能紊乱。α-萘异硫氰酸酯引起的细胞间紧密连接(封闭胆小管作用)的分离，损害胆汁分泌并导致胆汁酸和胆红素潴留，对肝脏和整个机体造成不良影响。

四、修复失调与适应

(一) 损伤修复机制

1. 分子修复　受损害的分子可以不同的方式修复，某些化学改变如蛋白质巯基的氧化和DNA的甲基化可被简单地逆转，而有些受损分子则需要完全降解并重新合成后才能有效地修复。

(1) 蛋白质修复：巯基被氧化将使许多蛋白质如受体、酶、结构蛋白和TF等功能受损。巯基被氧化的蛋白质，可以通过依赖NADPH还原酶的作用而将其还原，其中氢来源于磷酸戊糖旁路中6-磷酸葡萄糖脱氢酶和6-磷酸葡萄糖醛酸脱氢酶催化脱氢。高铁血红蛋白的还原依赖于高铁血红蛋白还原酶，通过细胞色素b5获得电子。细胞内可溶性蛋白对各种物理或化学刺激均很敏感，容易变性。蛋白质变性后合成的大量热休克蛋白对变性蛋白的再折叠起重要作用。受损蛋白质也可通过水解而消除，例如，接触氟烷后肝脏产生具有免疫原性的三氟乙酰化蛋白质被溶酶体蛋白酶所降解。ATP/泛素依赖性蛋白酶体(proteosomes)在有效调节胞内某些重要调控蛋白(如p53、IKB、细胞周期蛋白)水平的同时，对变性蛋白质的清除也发挥重要作用。红细胞中含有不依赖ATP的非溶酶体蛋白水解酶，可迅速而有选择性地降解HO˙引起的变性蛋白质。受损蛋白质的清除对维持眼晶体的透明度至关重要。

(2) 脂质修复：过氧化脂质的修复涉及一系列的还原剂和谷胱甘肽过氧化物还原酶；含有脂肪酸过氧化物的磷酸，易于被磷脂酶A_2水解，由正常脂肪酸代替过氧化脂肪酸。还原剂的恢复还需要NADPH的参与。

(3) DNA修复：尽管DNA极易与亲电子物和自由基反应，但核内DNA还是非常稳定的。原因是它一方面被包裹于染色体中，另一方面还有几种修复机制(包括直接修复、切除修复、重组修复等)来纠正这一改变。但是，由于线粒体DNA缺乏组蛋白的保护和有效的修复机制，因而更易受到外源化学物的损害。

2. 细胞修复　在大多数组织，损伤的细胞死亡，以幸存细胞的分裂来取代丧失的细胞。但神经组织例外，由于成熟的神经元细胞失去增殖能力，当外周神经轴索损伤时，主要依靠巨噬细胞和施旺细胞(Sehwann cells)参与其修复过程。巨噬细胞通过吞噬作用清除细胞碎片并产生细胞因子与生长因子，激活施旺细胞增殖并从成髓鞘作用模式反分化为生长支持模式。施旺细胞合成细胞黏附分子，精确合成参与基膜构建的细胞外间质蛋白，产生一系列神经营养因子(如神经生长因子，胶质细胞衍生的生长因子)及其受体。施旺细胞与再生的轴索共同移动，通过物理引导和化学诱惑轴索而使靶细胞重新受神经支配。哺乳动物中枢神经系统轴索再生受到小突胶质细胞产生的生长抑制糖蛋白(NI35)和硫酸软骨素聚糖蛋白及星形胶质细胞产生的瘢痕所限制。因此，中枢神经元的损害是不可逆的，但部分可由大量储备的神经细胞来代偿，接替丢失的神经元的功能。

3. 组织修复　具有细胞增殖能力的组织，受损细胞通过凋亡或坏死而清除，受损组织则通过细胞增殖和再生而修复。

(1) 细胞凋亡：受损细胞的主动清除。由细胞损伤而启动的凋亡过程是组织修复过程的

一部分，其原因基于两个理由。其一是凋亡可以阻止导致坏死的过程。对于坏死细胞所在的组织，坏死是比凋亡更为有害的后果。即将凋亡的细胞出现皱缩，核和胞质物质浓缩，然后破裂为膜结合的碎片(凋亡小体)而被吞噬；而组织坏死时，细胞与细胞内细胞器肿胀并随着膜溶解而碎裂；凋亡是有序的，而坏死是无序的；坏死的细胞成分吸引入侵的炎症细胞，进而发生的炎症过程扩大了细胞损伤，而凋亡的细胞碎片不经炎症而清除。其二，凋亡可通过清除具有潜在致突变作用的 DNA 损伤细胞而阻拦肿瘤形成的过程。但是，受损细胞的凋亡作为一种修复过程仅对于由持续更新细胞或条件分裂细胞构成的组织具有最大的价值，因为在这些组织中凋亡的细胞可迅速被取代。如果神经元、心肌细胞和雄性精细胞出现大量凋亡，则导致器官功能的缺陷。

(2) 细胞增殖：组织的再生。组织是由各种各样的细胞与细胞外间质组成的。组织元件通过穿膜蛋白质相互锚定，钙黏蛋白(cadherin)使相邻细胞彼此黏附在一起，而间隙连接蛋白(connexin)通过间隙连接点在内部连接邻近的细胞，整连蛋白(integrin)使细胞与细胞外间质联系起来。因此，损伤组织的修复不仅涉及丢失的细胞和细胞外间质的再生，而且也涉及新形成元件的重新整合连接。在肝、肾和肺等实质性器官中，有各种不同类型的细胞参与组织修复过程。存在于组织间充质的非实质细胞如巨噬细胞和内皮细胞和迁移到损伤部位的细胞如单核细胞分泌刺激实质细胞分裂的细胞因子，同时刺激特定细胞如肝脏星状细胞合成细胞外间质分子。

细胞损伤后，邻近损伤区域的细胞迅速进入细胞分裂周期。给予大鼠低剂量四氯化碳 2～4 小时后，即可观察到肝脏有丝分裂；36～48 小时后，肝脏有丝分裂达到高峰，肝脏非实质细胞有丝分裂则相对滞后。在小肠黏膜和骨髓，干细胞首先分裂继而分化并取代受损的细胞。肝胆小管中也发现干细胞。当发生中毒性肝损伤、肝细胞复制障碍时，存在于肝胆小管中的干细胞增殖形成椭圆形细胞，并分化为肝细胞和胆管上皮细胞。在臭氧暴露的肺中，无纤毛 Clara 细胞和Ⅱ型肺细胞经过有丝分裂和分化，分别取代受损的有纤毛支气管上皮细胞和Ⅰ型肺细胞。

细胞损伤后细胞分裂周期的启动受多种基因的调控。细胞损伤早期，MAPKs 通路迅速启动并激活 NF - KB, AP - 1、C/EBP 等核转录因子，诱导即时早期反应基因快速表达。即时早期反应基因包括编码转录因子(如：*c - fos*、*c - jun* 和 *c - myc*)和细胞因子样分泌蛋白相关基因。即时早期反应基因产物通过直接刺激其他基因或通过细胞表面受体及偶联的转导网络放大初始的基因活化过程。细胞损伤数小时后，迟发早期反应基因(如：*Bcl* - 2 家族编码的抗凋亡蛋白 $Bcl - X_L$)开始表达，并调节细胞周期加速蛋白(如：细胞周期蛋白 D 和 *mdm2*)和细胞周期减速基因(如：*p*53 和 *p*21)表达。这样，基因表达重新进入程序，以保证 DNA 合成和有丝分裂优先于特定的细胞活动。例如，再生的肝细胞失去分化能力，使细胞色素 P450 表达降低，肝脏星形细胞停止蓄积脂肪和维生素 A。

再生过程是通过从损伤细胞释放化学介质来启动的。非实质性细胞如滞留的巨噬细胞和内皮细胞可感受这些化学信号并产生大量信号分子、细胞因子和生长因子。这些因子促进并传播再生过程。细胞因子 TNF - α 和 IL - 6 可促进静止期细胞向细胞周期过渡(“引爆”priming)，而肝细胞生长因子(HGF)和 TGF - α 启动细胞周期中已“引爆”的细胞向有丝分裂进展。HGF 并不仅限于肝脏，其他组织和器官滞留的巨噬细胞和内皮细胞(包括肝脏、肺和肾脏)均可表达 HGF 并以旁分泌方式活化邻近的实质细胞的受体。给予中毒剂量的四氯化碳后，肝和肾非实质细胞 HGF 表达显著增加，并引起血液 HGF 水平迅速升高。

细胞移动在某些组织重建过程中也起重要作用。胃肠道黏膜是一道重要屏障。当肠道黏膜受损后,残留的上皮细胞迅速移向损伤部位并延伸变薄以重建表面的连续性,这种连续性甚至可能在细胞复制之前即已进行。黏膜修复不仅受生长因子和细胞因子的支配,而且受特殊因子(如:胃肠道黏膜相关联的三叶肽)所支配。

(3) 细胞外基质的替代:细胞外基质由蛋白质、糖胺聚糖以及糖蛋白与蛋白聚糖的糖聚合体组成。肝脏细胞外基质由位于肝窦与肝细胞之间 Disse 间隙的星形细胞和脂肪贮存细胞合成。星形细胞在肝脏再生期间被激活,发生有丝分裂和重要的表型改变。这些表型改变包括细胞外间质成分合成与分泌增加、脂肪和维生素 A 丢失及肌动蛋白表达。因此,休眠的星形细胞被反向分化为肌成纤维细胞样(myofibroblast-like)收缩和分泌细胞。星形细胞的激活主要是由血小板生长因子(PDGF)和转化生长因子-β(TGF-β)所介导。这两种生长因子均可从血小板释放,TGF-β也可由活化星形细胞释放但主要来源于库普弗细胞。PDGF 促进星形细胞的增殖,而 TGF-β通过启动 MAPKs 信号通路刺激星形细胞合成的合成胶原、纤连蛋白(fibronectin)、生腱蛋白(tenascin)和蛋白聚糖等细胞外间质成分。TGF-β在其他组织的细胞外间质形成中也起核心作用,只是作用的靶细胞不同。

(二) 细胞应激机制

细胞应激(celluar stress)指细胞处于不利环境和遇到有害刺激时所产生的防御或适应性反应。细胞应激分为热应激(heat stress)、缺氧应激(hypoxic stress)、氧化应激(oxidative stress)、内质网应激(endoplasmic reticulum stress)和遗传毒性应激(genotoxic stress)。能导致细胞应激的物理、化学和生物因素称为应激原,包括 DNA 损伤性应激原和非 DNA 损伤性应激原。DNA 损伤性应激原主要有紫外线、离子射线、活性氧、化学致畸剂、化学致癌剂和化学致突变剂,DNA 损伤性应激原介导的细胞应激称为基因毒性应激;非 DNA 损伤性应激原主要有创伤、感染、营养剥夺、渗透压改变、缺氧和热应激,非 DNA 损伤性应激原介导的细胞应激称为非基因毒性应激(如热应激、缺氧应激、氧化应激和内质网应激)。

1. 热应激　热应激是最早被认识的细胞应激反应,其特征性反应是诱导细胞表达生成热休克蛋白(heat shock protein, HSP)。由于 HSP 的产生不限于热应激,缺氧应激、氧化应激和基因毒性应激也可诱导 HSP 生成,故 HSP 又被称为应激蛋白(stress protein)。HSP 按其分子量分成若干个家族,与应激关系最为密切的是 HSP70 家族。HSP 能作为分子伴侣(molecular chaperone)参与新合成蛋白质的正确折叠和运输;HSP 能识别并结合于变性蛋白质暴露的疏水区域防止其凝聚,协助蛋白酶系统对其进行降解或帮助其重新形成天然构象;HSP 可增强机体对多种应激原的耐受能力。

2. 氧化应激　氧化应激的应激原主要为自由基、活性氧(reactive oxygen species, ROS)或活性氮(reactive nitrogen species, RNS)。通常引起机体发生氧化应激的自由基包括羟自由基(OH·)、超氧阴离子自由基(O_2^-·)、过氧自由基(ROO·)、氯离子自由基(Cl·)和一氧化氮分子自由基(NO·)。生理状态下,ROS 和 RNS 是机体维持多种重要生理功能的物质基础。当机体因暴露毒物而产生过多自由基、ROS 或 RNS,或因机体抗氧化能力减弱引起 ROS 或 RNS 清除能力减弱,细胞内自由基、ROS 或 RNS 过量破坏了机体的氧化/还原的正常平衡,导致组织和细胞发生氧化应激。氧化应激是真核细胞的一种保护性应激反应。氧化应激早期,机体通过启动细胞内抗氧化防御系统,清除过量的自由基,使细胞免于氧化性损伤。氧化应激通常具有细胞应激特有的两重性:机体随氧化应激反应在清除过量自由基和 ROS 的同时,也可能导致细胞调节功能和细胞维持功能障碍,甚至引起细胞凋亡和自噬。目前认为

ROS 通过下列机制诱导细胞凋亡：①线粒体机制：ROS 直接作用于线粒体，导致位于线粒体的促凋亡 *Bcl*－2 家族成员激活，启动细胞凋亡程序；②过量生成的 ROS 通过激活内质网应激信号通路，启动细胞凋亡程序。因体内自由基和 ROS 生成过量而引起的氧化应激，可能对机体产生暂时或持久损害。

3. *缺氧应激*　细胞和组织为适应低氧压力而诱导系列涉及血管生成、铁代谢和糖代谢相关基因的表达，以维持细胞的增殖和存活，这一过程称为缺氧应激。低氧是最重要的缺氧应激原。重金属、砷、细菌脂多糖、IL－1、胰岛素、胰岛素样生长因子、TNF－α、去铁胺、凝血酶均可引起缺氧应激。NADPH 氧化酶是最可能的氧感受器，识别缺氧。Ca^{2+}、NO 和 CO 在低氧信号转导过程中均发挥重要作用。介导缺氧应激反应的关键分子是缺氧诱导因子 1（hypoxia-inducible factor－1，HIF－1）。HIF－1 由 HIF－1α 和 HIF－1β 两种亚基组成，为异源二聚体转录因子。HIF－1β 亚基在细胞质中稳定表达，而 HIF－1α 亚基的稳定性取决于其自身羟基化、乙酰化、泛素化和磷酸化水平。正常氧饱和状态下，HIF－1α 亚基被泛素-蛋白酶体水解复合体降解，细胞中基本检测不到 HIF－1α 亚基；缺氧状态下，HIF－1α 亚基降解受到显著抑制，并与 HIF－1β 亚基形成有活性的 HIF－1，转移到细胞核内调节多种基因的转录，对维持在缺氧条件下红细胞生成和血管形成、细胞能量代谢和细胞在缺氧状态下的增殖和存活起重要作用。

4. *内质网应激*　内质网是细胞内重要的细胞器，蛋白质和脂质合成、加工、折叠和运输均在内质网进行。内质网蛋白质加工和包装需要内质网特异性分子伴侣如糖调节蛋白 78（glucose regulated protein 78，GRP78）的协助。当细胞内质网受损或需要加工和包装的蛋白质合成增加即引起内质网应激和非折叠蛋白反应（the unfolded protein response，UPR）。3 个主要内质网跨膜蛋白（即 IRE1、PERK 和 ATF6）介导内质网应激和非折叠蛋白反应信号通路。目前认为，发生下列情况之一即可能诱发内质网应激反应：①内质网特异性分子伴侣的减少或缺乏；②内质网 Ca^{2+} 耗竭；③氧化应激或缺氧应激；④基因突变影响到基因产物蛋白质分子折叠；⑤二硫键形成的减少。研究证实，过量活性氧和一氧化氮产生引起的氧化应激是诱发内质网应激的重要因素，而缺氧应激和热应激通常会伴随内质网应激。

5. *遗传毒性应激*　人体细胞启动自身防御网络系统以应对遗传物质 DNA 免受外源遗传毒物损伤的过程称为遗传毒性应激。遗传毒性应激反应的应激原主要有遗传毒性致癌剂和致突变物、紫外线和放射性核素、大多数化疗药物，也包括细胞正常生命过程产生的某些代谢产物（如自由基和活性氧）。丝裂原活化蛋白激酶（MAPKs）途径是细胞遗传毒性应激反应中主要信号转导途径之一，MAPKs 途径主要包括 ERK、JNK/SAPK 和 P38 通路。MAPKs 途径不同通路通过特异的 MAPK 信号级联放大反应使细胞形成应对 DNA 损伤的应激反应，从而保证细胞正常生长和 DNA 复制的保真度。MAPKs 级联反应的启动依赖于 DNA 损伤的识别。毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白（ataxia telangiectasia-mutated，ATM）、ATM 与 Rad－3 相关蛋白（ATM and Rad related，ATR）和 DNA 依赖性蛋白激酶（DNA-dependent protein kinase，DNA－PK）在 DNA 损伤识别和随后的 MAPKs 级联反应启动过程起重要作用。

细胞应激涉及从细胞能量代谢、蛋白质合成与加工、细胞内环境稳态的建立与维持、细胞遗传物质损伤的识别与修复、细胞增殖与细胞周期的调控和细胞存活与凋亡等生命活动所有过程。一方面，细胞应激是机体面对有害因素刺激的防御性反应，有利于维持机体内环境的相对稳定；另一方面，细胞应激过程引起细胞信号转导的迅速改变，某些重要信号分子或信号通

路的改变可能损害细胞的正常功能。细胞应激与衰老、恶性肿瘤、心脑血管疾病、机体炎症反应、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病、非酒精性脂肪肝病和先天性出生缺陷等人类重要疾病的发病过程密切相关。

(三) 修复障碍引起的毒作用

1. 修复障碍　虽然修复机制发生在分子、细胞和组织水平,但有时不能对损伤起保护作用。首先,修复机制保真度并非绝对,某些损伤的修复可能被遗漏;其次,损伤程度超过机体修复能力时,修复失效;此外,修复所必需的酶或辅因子被消耗时,修复能力耗竭;最后,某些毒性损害不能被有效地修复,例如,当出现外源化学物共价地结合于蛋白质时,机体不能有效地修复。当机体修复机制崩溃、耗竭或削弱时,化学物即对机体产生毒性作用。

机体对毒物引起的损伤进行修复的过程中也可能引起毒性,当然,这种情况通常是被动发生的。例如,因 DNA 损伤修复过程消耗过量 NAD^+,机体抗氧化过程消耗过量 NAD(P)H 均可危及氧化磷酸化过程,导致或加剧 ATP 耗竭,从而引发细胞损害;DNA 的切除修复和脂质的再酰化作用也因为消耗大量的 ATP 而导致细胞供能障碍和损伤。修复过程也可能主动产生毒性作用。例如,慢性组织损伤后,当修复过程偏离正确轨道,导致不可控制的增生而不是组织的重建,细胞增生即可形成肿瘤,而细胞外间质的过度产生则导致组织纤维化。

2. 修复障碍引起的毒性

(1) 炎症

1) 细胞与介质:炎症的形成标志为微环境的改变和炎症细胞的聚集。该过程的启动常因组织损伤巨噬细胞分泌各种细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL-1)等,这些刺激素刺激邻近基质细胞(如内皮细胞等)释放介质,诱发局部微血管扩张并引起毛细血管通透性增加。激活的内皮细胞也能通过释放趋化细胞因子、表达细胞黏附分子等,促进循环中白细胞在炎症局部的聚集。

2) 活性氧和活性氮:集中在损伤部位的巨噬细胞和白细胞发生呼吸爆炸,产生并释放大量自由基和水解酶,损害邻近正常组织。炎症过程中自由基主要来源于 3 种氧化酶:NAD(P)H 氧化酶、一氧化氮合酶和髓过氧化物酶。NAD(P)H 氧化酶源自由基产生过程如下:



$$NAD(P)H + 2O_2 \longrightarrow NAD(P)H^+ + H^+ + 2O_2^{-\cdot}$$



$$2O_2^{-\cdot} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + HOOH$$



$$HOOH + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^\cdot$$

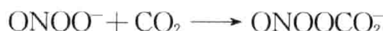
另一种细胞毒性自由基一氧化氮($NO^\cdot$)是由巨噬细胞产生的,而不是由粒细胞产生。这种自由基在一氧化氮合酶催化下由精氨酸生成。该酶在巨噬细胞中可由细菌内毒素和细胞因子(IL-1 和 TNF-α)诱导:



$$L\text{-精氨酸} + O_2 \longrightarrow L\text{-瓜氨酸} + NO^\cdot$$



$$O_2^{-\cdot} + NO^\cdot \longrightarrow ONOO^-$$



$$ONOO^- + CO_2 \longrightarrow ONOOCO_2^-$$



$$ONOOCO_2^- \longrightarrow NO_2^\cdot + CO_3^{-\cdot}$$

粒细胞释放的溶酶体髓过氧化物酶到吞噬的细胞外间隙——吞噬囊泡中。髓过氧化物酶催化过氧化氢(HOOH)与 Cl^- 反应生成强氧化剂次氯酸(HOCl),并接受 Fe^{2+} 或 $O_2^{-\cdot}$ 转移的

电子进一步生成 HO˙：



$$HOOH + H^+ + Cl^- \longrightarrow HOH + HOCl$$



$$HOCl + O_2^{-\cdot} \longrightarrow O_2 + Cl^- + HO^\cdot$$

(2) 坏死：细胞损伤向组织坏死进展可被两种协同的修复机制所中止：凋亡与细胞增生。损伤的细胞可启动凋亡过程，凋亡通过阻止损伤细胞的坏死和随后的炎症反应(可通过释放细胞毒性介体而引起损伤)而行使这种功能。临近受损细胞的正常细胞，在损伤发生后很快被启动增生过程，阻碍了毒作用的进一步发展。给予大鼠低剂量的四氯化碳，在几个小时内即可在肝细胞内发现一个有丝分裂的高峰，早期的细胞分裂被认为是迅速恢复组织损伤、防止坏死的表现。先给予大鼠一定剂量的十氯酮(chlordecone)，阻断早期细胞分裂，再给予非坏死剂量的四氯化碳将可引起肝坏死。

在毒物引起组织坏死的剂量反应关系中，有效的修复是一个重要条件。也就是说，毒物引起组织坏死不仅是因为它在毒作用点达到一定的剂量，而且由于损伤超过了修复能力，使得损伤能进一步恶化。例如，低剂量的四氯化碳在肝脏引起凋亡和有丝分裂，高剂量则引起坏死。

(3) 纤维化：纤维化是一种以异常成分在细胞外间质过度沉积为特征的病理损害。细胞损伤启动急速增加的增生和细胞外间质形成，这种情况通常在损伤的组织重塑(改建)时中止。假如细胞外间质产生的增加没有被终止，纤维化就会发生。长期饮酒或慢性接触四氯化碳等，可致肝脏纤维化或肝硬化。长期吸入某些矿物质或使用某些药物如博来霉素(争光霉素)等，可致肺纤维化。亚德利亚霉素可致心脏纤维化。多数致纤维化的化合物可产生自由基和引起细胞慢性损伤。异常修复是纤维化的一个主要因素。如前所述，细胞损伤启动细胞增生和细胞间质的合成。正常情况下，损伤修复后，细胞间质的合成即停止，否则产生纤维化。

细胞间质的过度合成，受非实质性细胞所产生的细胞因子的控制。虽然有多种纤维化介导因子，但 TGF－β 是纤维形成的主要介质，TNF－α 和血小板生长因子也参与纤维化过程。

纤维化的不利影响有 4 个方面：①瘢痕收缩压迫实质性细胞和血管；②其基膜成分沉积于毛细血管内皮细胞和实质性细胞之间形成扩散屏障，导致组织细胞营养不良；③细胞外间质数量和刚度的增加对整个组织的弹性和易曲性造成不良的影响，危及器官如心、肺的机械功能；④改变细胞间环境，通过跨膜蛋白和耦联的细胞内信号转导网络，影响细胞极性、运动性和基因表达。

(4) 致癌作用：化学致癌过程涉及各种修复机制的功能不足：①DNA 修复失效，通过 DNA 复制导致突变固定，并最终引起原癌基因活化和抑癌基因失活；②细胞凋亡的失效，促进突变和癌前细胞的克隆扩展；③终止增生过程失效，增加突变概率、引起原癌基因过表达、启动细胞克隆扩展形成结节和肿瘤；④作为非遗传毒性致癌物，起有丝分裂促进剂和细胞凋亡抑制剂的作用。

第三节　毒性作用影响因素

毒性作用是毒物与生物(人或动物)机体相互作用的结果。毒性作用出现的性质和强度主要受 4 个方面的影响：①化学物因素；②机体因素；③外源化学物与机体所处的环境条件；④化学物的联合作用。

一、化学物因素

(一) 化学结构

化学物的化学结构直接影响其毒作用的性质和毒性的大小,因为化学结构决定了将会发生的代谢转化类型及其可能参与和干扰的生化过程。研究化学物的化学结构与其毒性作用之间的关系,找出其规律,有助于通过比较预测,开发高效低毒的新化学物;从分子水平上推测新化学物的毒作用机制;预测新化学的毒性效应和安全接触剂量。这些已成为毒理学中的预测毒理学的重要部分,即构效关系(SARS)和定量构效关系(QSARS)的研究。化学结构与毒性的关系相当复杂,举例如下。

(1) 取代基不同毒性不同:苯具有麻醉作用和抑制造血功能的作用,当苯环中的氢被甲基取代后(成为甲苯或二甲苯)抑制造血功能的作用不明显,但麻醉作用大于苯。苯环中的氢被氨基取代后,其作用性质有很大改变,具有形成高铁血红蛋白的作用。苯环中的氢被硝基(硝基苯)或卤素取代(卤代苯)后,具有肝脏毒性。烷烃类的氢若为卤族元素取代时,其毒性增强,对肝的毒作用增加;且取代愈多,毒性愈大,如 $CCl_4>CHCl_3>CH_2Cl_2>CH_3Cl$。

(2) 异构体和立体构型的影响:异构体的生物活性有差异,典型的例子是六六六,有 7 种同分异构体。常用的有 α、β、γ 和 δ 等,毒性差别很大:γ、δ-六六六急性毒性强;β-六六六慢性毒性大;γ-六六六对中枢神经系统有很强的兴奋作用;β、δ-六六六则对中枢神经系统有抑制作用。

带两个基团的苯环化合物的毒性是:对位>邻位>间位,分子对称的>不对称的。例如,1,2-二氯甲醚>1,1-二氯甲醚。三邻甲苯膦酸酯(TOCP)可导致迟发性神经毒性,但当邻位的甲基转到对位,则失去了迟发性神经毒性。沙利度胺的 S(-)镜像物比 R(+)镜像物有更强的胚胎毒性。

(3) 同系物的碳原子数和结构的影响:直链饱和烃多具有麻醉作用。甲烷和乙烷是惰性气体,仅仅在高浓度时引起单纯窒息作用。从丙烷起随着碳原子数的增多麻醉作用增强;但超过 9 个碳原子后,由于其脂溶性随着碳原子数的增多而增加,水溶性下降,不利于经水相转运,在机体内易滞留于最先遇到的脂肪组织中,不易到达靶组织,故对人体产生麻醉作用的危险反而逐步减少。碳原子数相同时直链化合物毒性大于异构体,成环化合物毒性大于不成环化合物。

(二) 理化性质

化学物的理化特性对于它在外环境中的稳定性,进入机体的机会与体内代谢转化过程均有重要影响。

1. 脂/水分配系数(lipid/water partition coefficients)　这是指达到动态平衡时化学物在脂相(正辛醇)和水相中的溶解分配率的平衡系数。化学物的脂/水分配系数大表明它脂溶性高,是亲脂性的,易以简单扩散的方式通过脂质双分子层,易在脂肪组织中蓄积——如 DDT,易侵犯神经系统——如四乙基铅。但是,脂溶性极大的化学物不利于经水相转运。

化学物的脂/水分配系数小,表明它水溶性高。毒物在水中的溶解度直接影响毒性的大小。一般认为,在同系化合物中,水中溶解度越大,毒性愈大。例如,砒霜(As_2O_3)在水中的溶解度是雄黄(As_2S_3)的 3 万倍,其毒性远远大于雄黄。此外,化学物水溶性可影响其毒作用部位,如氟化氢(HF)、氨等易溶于水的刺激性气体主要溶解于上呼吸道表皮上覆盖的水性黏液,

并引起局部刺激和损害作用；而不易溶解的二氧化氮(NO_2)则可深入至肺泡，引起肺水肿。

2. 颗粒大小　外源化学物微粒的大小与分散度成反比。分散度越大粒子越小，其比表面积越大，表面活性越大。例如，一些金属烟的表面活性大，可以与呼吸道上皮细胞或细菌等蛋白质作用，引起发热，即所谓的金属热。而分散度较小，微粒较大的金属粉尘却不能引起金属热。毒物颗粒的大小可影响其进入呼吸道的深度和溶解度，从而可影响毒性作用。

3. 挥发性　挥发性液态化学物的毒性与其固有毒性和挥发性有关。在常温下易挥发的化学物易形成较大的蒸气压，易于经呼吸道吸入。例如，苯与苯乙烯的 LC_{50} 均为 45 mg/L 左右，但苯的挥发性较苯乙烯大 11 倍，故其危害性远较苯乙烯为大。如果同为易于经皮吸收的液态化学物，则挥发性大的较挥发性小、黏稠不易祛除的危害性小，因为其接触时间较短。在慢性毒性试验时，用喂饲法染毒应注意毒物的挥发性，毒物加入饲料中可因挥发而减低剂量。

4. 气态物质的血/气分配系数(blood/gas partition coefficients)　这是指当呼吸膜两侧的气体的分压达到动态平衡时，其在血液中的浓度和肺泡气中的浓度之比。该系数可影响到达肺泡的气态物质通过简单扩散跨呼吸膜吸收入血，系数越大越易被吸收入血。

5. 比重　气态和蒸汽态外源化学物的比重在某些特殊情况下是值得重视的。在密闭的、长期空气不流通的空间，如沼气池、竖井、地窖、地沟和非矿井中，有毒气体可能因比重不同而分层，不乏贸然下去导致中毒事故的报道。化学性火灾的有毒烟雾比重较轻，应匍匐逃生。

(三) 不纯物和外源化学物的稳定性

评价外源化学物的毒性应尽可能采用纯品。实际工作中，常常需要评价工业品和商品的毒性。受检样品中常含有不纯物，包括原料、杂质、副产品，以及溶剂、赋形剂、稳定剂和着色剂等。这些不纯物可能影响受检化学物的毒性，其中有些不纯物的毒性比受检化学物的毒性高，可影响对受检样品毒性的正确评价。毒物在使用情况下不稳定可能影响毒性，如有机磷酸酯杀虫剂库马福司在储存中形成的分解产物对牛的毒性增加。所以，在进行毒理学实验研究之前，应获得使用情况下的稳定性的资料。

二、机体因素

(一) 种属与品系的差异

1. 一般生理学差异　许多化学物能够损害一种机体而不损害其他种机体，此种选择性与物种生理学和生物化学特性的不同有关。选择毒性由于生理学的不同，植物在许多方面不同于动物，如植物缺乏神经系统、有效的循环系统和肌肉，而有光合作用机制和坚硬的细胞壁。许多杀虫剂的动物毒性由于对动物神经系统的作用，植物因此是相对不敏感的。另一方面，动物对大多数除草剂是相对不敏感的。细菌有细胞壁，哺乳动物和人细胞没有，此已被用于发展选择毒性化学疗法药物，像青霉素和头孢菌素杀灭细菌，但是对哺乳动物的细胞相对无毒性。选择毒性也可能是在两种机体中存在不同的生物化学途径的结果。例如，细菌不吸收叶酸，但是可从对-氨基苯甲酸、谷氨酸和蝶啶合成叶酸，而哺乳动物不能合成叶酸，必须从饮食中吸收。磺胺类药物在电荷和大小上与对-氨基苯甲酸相似，拮抗对-氨基苯甲酸结合至叶酸分子，所以对细菌有毒性，人不进行此反应故相对无毒性。

2. ADME 过程或靶敏感性差异　不同动物物种对毒物的反应变异可能是由于化合物的 ADME 过程或靶敏感性的不同，动物物种之中观察到的毒效应在性质上和数量上的不同最常见的解释是代谢的不同。不同物种的毒性反应差别往往是由于解毒机制不同造成的。例如，

环己巴比妥对各种实验动物所造成的睡眠时间的明显不同，显然是由于解毒酶活性的不同。不同品系小鼠对环己巴比妥的反应也不尽相同，虽然其差别不如上述显著。

在实验动物和人之间有许多生理学的和解剖的类似性，此为毒理学评价使用动物提供依据。然而，动物物种之间毒效应在性质上和数量上的不同对物种间外推的影响不能忽视。

物种间解剖、生理和生化的不同取决于物种间遗传因素的差异。对于人和动物结构基因组和功能基因组的比较研究将有助于阐明物种间差异，并有助于将实验动物的结果外推到人。

(二) 个体反应的差异

1. 遗传学差异　与外源化合物的活化和(或)解毒作用有关的酶活性表达的程度变异显著地影响个体对于这些物质的毒性反应。这些变异可能是由于个体的遗传学差异。在人群中发生的可遗传的基因差异≥1%水平，被定义为基因的多态性。例如，N-乙酰化酶类可生物转化含有芳香胺或肼基的多种药物和其他化学品。因为一些物质已知是致癌物，特别引起膀胱癌症，N-乙酰化转移酶类的多态性已经被详细地调查。在许多人群已经报告，与对照组比较，在膀胱癌症患者之中的慢乙酰化者有显著增加。相反，在有结肠癌和结肠息肉患者中已经发现快乙酰化者较多。

许多种外源性化学物的代谢酶都具有多态性。目前较确切的有细胞色素 P450 酶类(CYP)，环氧化物水解酶(EH)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)、谷胱甘肽转移酶(GST)、N-乙酰基转移酶(NAT)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)等。

2. 性别　同种同系的雌雄动物常常对毒物的反应是相似的，往往在敏感性方面具有较明显的量的差别。性别差异表现在实验动物性发育成熟开始，直至老年期，可见性激素的性质和水平起了关键性作用。据研究，雄性激素能促进细胞色素 P450 的活力。因此，经该酶系代谢解毒的化学毒物对雌性动物表现的毒性大，而经该酶系代谢活化的化学毒物对雄性动物的毒性大。特别是大鼠，外源化学物对雌性大鼠的毒作用常大于雄性大鼠，但相反的例子也有。例如，很多巴比妥类药对雌性大鼠引起的睡眠时间较雄性为长。环己巴比妥对雄性大鼠作用时，时间较短的原因是雄鼠体内使此化合物羟基化的肝微粒体酶的代谢活性较高，去势或给以雌激素可使酶活性降低。同样，雄性大鼠对氨基匹林的去甲基作用和对磺胺类的乙酰化作用较雌鼠为快，因而较不敏感。雌性大鼠对一些有机磷杀虫剂(如谷硫磷和对硫磷)也较雄鼠敏感。去势和给以激素可消除这种差别，但两种性别的断乳大鼠对这些毒物的敏感性却是相同的。然而，与环己巴比妥不同，对硫磷在雌性大鼠体内的代谢较雄鼠为快。对硫磷的代谢越快，则其代谢产物对氧磷的浓度越高。而对氧磷的毒性远比其原形化合物为大。这种由于雌鼠的生物活化作用较强而造成其毒性反应比雄鼠更大的情况，也适用于需要经过环氧化作用的艾氏剂和七氯。雌性大鼠对华法林(Warfarin)和士的宁也比较敏感。另一方面，雄性大鼠对麦角和铅却较雌性大鼠敏感。

3. 年龄　在出生最初几天/几周内和在老年人中，其毒性化合物代谢与健康的成人有很大差异。在婴儿必须考虑4个因素：在最初几天中肠道和血-脑屏障未完全发育，因此许多物质在胃肠道中易被吸收并到达中枢神经系统；婴儿肝脏的解毒反应(如胆红素的葡萄糖醛酸结合)和外源物的肾排除不像儿童期和成人有效。

对于大多数毒物，幼年动物的敏感性为成年动物的1.5～10倍。现有的资料表明，幼年动物对很多毒物比较敏感的主要原因在于缺乏各种解毒酶系统，可能Ⅰ相和Ⅱ相反应都较弱。例如，一次给予10 mg/kg 的环己巴比妥后，1日龄小鼠的睡眠时间超过360分钟，而21日龄小鼠则为27分钟。环己巴比妥在这些动物体内3小时后氧化代谢的比例分别为0%和

21%～33%。氯霉素主要以葡萄糖醛酸结合物的形式排出体外，一次给予1或2日龄的新生儿50 mg/kg后，在48小时内血浓度为15 μg/ml或更高。相反的，在1～11岁的儿童这样水平的血浓度只能维持12小时。某些毒物在幼年动物的体内的吸收较成年为多。例如，儿童对铅的吸收较成年人多4～5倍，对镉则多20倍。幼年动物对吗啡较为敏感的原因是由于血-脑屏障的不完全。

然而，并不是所有化学物质对年幼的动物毒性都大，如中枢神经兴奋剂对新生动物的毒性较小。DDT对新生大鼠的半数致死量为成年大鼠的20倍以上。这种对DDT毒性的耐受性对于评价该农药的潜在危险性可能很有意义，因为婴幼儿通过母乳和牛乳所摄入的DDT较多，尤其按每公斤体重计算时。年龄对其他中枢神经兴奋剂(如其他有机氯杀虫剂)的敏感性的影响似乎没有如此明显(一般为2～10倍)。很多有机磷农药对幼年动物的毒性更大；八甲磷和苯硫脲显然是例外。除生物转化方面的不同，其他因素也有作用，如已发现受体敏感性降低是幼年大鼠对DDT相对地不敏感的原因。

4. 生理状态　在妊娠的时候，母体每一器官系统均发生生理学变化，而且为了要支持胎儿和生殖组织的迅速生长，这些变化可能显著影响对毒物的处置。妊娠母体的胃肠运动受抑制，可能使亲水化合物吸收增强。在妊娠期时分布体积通常增加，由于各种组织和液体体积明显增加，因此在妊娠后期亲水药物的起始浓度将低于妊娠早期。母体脂肪量增加可能增加机体亲脂化合物负担。主要由于血浆体积的增加，血浆蛋白质(主要是白蛋白)的浓度在妊娠期第7～9个月期间减少，因此，造成较多的游离毒物可经胎盘转移，至少在哺乳的早期排入乳内。在妊娠期间母亲的血浆pH保持稳定，但是胚体/胎体隔室的pH与母体的血浆相关，在与器官发生晚期和胎体发育期相比处于较酸性的环境。在妊娠早期弱酸性的化学品在器官发生早期经胎盘转移和蓄积，在妊娠后期弱碱性化学品更易转移。在妊娠期间肾的血流和肾小球的滤过率增加，这些变化可提高肾毒物清除率，以致血浆浓度随妊娠的进展更快地降低。作为例外，在妊娠期间咖啡因的清除率减少。

分娩后，乳房的血流和乳生成的增加强烈地影响毒物被转移至乳的数量。毒物转移进入乳内的数量和速率依赖毒物pKa、脂溶性、分子量，并依赖蛋白质结合和在血浆及乳之间的pH梯度。特别关注的是新生儿在妊娠期蓄积的脂溶性毒物，如二噁英(dioxins)。在分娩后如体内脂肪逐渐减少到非妊娠水平，母体内其余部位的亲脂毒物浓度增加，使毒物经哺乳转移达到婴儿的可能性增加。

5. 营养状态　营养状态对许多化合物的生物利用度有强烈的影响。例如，饮食缺铁增强镉经胃肠吸收；血清铁蛋白水平低的女性对镉的吸收为正常的两倍。植酸是大多数种子和谷类谷粒主要贮存磷的化合物，为干重的1%～7%，而且有螯合多价金属离子的能力，尤其与锌、钙和铁。此种结合能形成难以从胃肠道吸收的不溶性的盐，显著减少上述无机物的生物利用度。

矿物质(钙、铜、铁、镁和锌)缺乏可降低细胞色素P450催化的氧化和还原反应。基础的细胞色素P450的减少能部分解释较低的生物转化活性。恢复至正常饮食后，矿物质摄取可使P450活性恢复到生理学水平。

维生素(C，E和B复合物)缺乏可减少外源化学物生物转化的速率，这些维生素直接地或间接地参与细胞色素P450系统的调节。维生素缺乏还能改变能源和细胞的氧化还原状态，阻碍对Ⅱ相生物转化所必需的高能因子的生成。再增加饮食的维生素摄入会使Ⅱ相生物转化恢复到基础活性。维生素A缺乏可增高呼吸道对致癌物的敏感性。另一方面，食物中的物质

可能干扰某维生素类的内源活性，例如，喂抗氧化剂如丁羟基甲苯(BHT)的大鼠可降低维生素 K 依赖的凝血活性，导致出血性死亡，而饲料补充维生素 K 可避免此效应。

6. 疾病　肝脏是化学物质进行生物转化的主要器官。肝脏疾病显著地影响外源化学物的代谢。有 3 个主要的因素涉及肝脏疾病改变外源化学物的代谢：①肝脏血流的改变影响运送外源化学物至代谢部位；②存活的肝细胞减少，可能降低代谢的能力；③白蛋白生成减少，可能造成游离药物较高的浓度，导致药物较高的组织浓度并可增强毒性。有肾功能缺损时外源化学物的肾小球的滤过作用和肾小管分泌通常都降低，导致许多化学品的清除率减少。肾脏病的尿毒症可能与血-脑屏障的通透性增加相关。

其他的疾病状态，如糖尿病和高血压也能导致外源化学物的代谢改变，应激也显示可引起外源化学物代谢和免疫毒性的改变。原发性肝癌高发病率与乙型肝炎病毒感染和高水平黄曲霉素摄取有关系。

三、环境因素

在接触环境化学物的同时，往往还同时受到生活或劳动环境中气象条件、噪声、振动和辐照等物理因素的影响。

(一) 气象条件

1. 气温　外源化学物及其代谢物在体内的剂量受其 ADME 过程的影响，而这些过程又与环境温度有关。另一方面，有些化学物本身可直接影响机体的体温调节过程，从而改变机体对环境温度变化的反应性。在高温环境下，机体皮肤毛细血管扩张，血循环和呼吸加快，可加速化学物经皮吸收和经呼吸道吸收，增高一些化学物的毒性，如氮氧化物、硫化氢的刺激作用增加。但是，温度对毒性的影响比较复杂，如有机磷类中的沙林则在低温下毒性增高。

2. 气湿　在高湿环境下，某些化学物如 HCl、HF、NO 和 H_2S 的刺激作用增大。某些化学物则在高湿条件下发生改变，如 SO_2 一部分可变成 SO_3 和 H_2SO_4，从而使毒性增加。此外，在高湿情况下，冬季易散热，夏季则反而不易散热，所以会增加机体体温调节负荷，从而影响其对化学物的感受性。

3. 气压　人们对气压影响化学物质毒性的兴趣始于人类在宇宙空间和潜水设备中接触气压的改变。一般情况下，气压变化不会很大，对毒性也无明显影响。但在特殊情况时，气压增高，往往会影响大气中污染物的浓度。气压降低，可致 CO 的毒性增大。在高原上，洋地黄和士的宁的毒性降低，而安非他命的毒性则增加，气压改变对化学物质毒性的影响主要是由于氧张力的改变，而不是压力的直接作用。

(二) 季节或昼夜节律

昼夜节律主要与日光周期有关的生理功能发生周期性变化之故。生物体的许多机能活动常有周期性的波动。如 24 小时的(昼夜节律)或更长周期(季节节律)的波动。毒物的毒性可因每日给药的时间不同或给药的季节不同而有差异。如苯巴比妥对小鼠的睡眠作用于下午 2 时给药的出现睡眠时间最长，而清晨 2 时给药睡眠时间最短(为下午 2 时给药的 40%～60%)。大鼠血嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和白细胞计数的量均呈现昼夜节律。人排出某些药物的速度亦显示有昼夜节律。例如，口服水杨酸，于早上 8 时服，排出速度慢，在体停留时间最长，而晚上 8 时服，排出速度快，在体内停留时间最短。这种机能活动的昼夜节律有的是受体内某种调节因素所控制，如切除肾上腺后的大鼠其昼夜节律变得不明显；有的是受外环境因素

如进食、睡眠、光、温度等所调节，如单独笼养动物昼夜节律的幅度减小。此外，某些毒物的毒性尚有季节性的差异。例如，给予大鼠苯巴比妥钠的睡眠时间以春季最长，秋季最短（只有春季的 40%）。有人认为动物对毒物毒性敏感性的季节差异，与动物冬眠（hibernation）反应或不同地理区域的气候有关。

（三）暴露途径

对于一种化学物来说，与暴露有关的毒性影响因素主要是暴露剂量、暴露途径、暴露持续时间和暴露频率。

毒物进入体内的主要途径是胃肠道（摄食）、肺（吸入）和皮肤（局部渗入）以及其他胃肠外（不经肠道）途径。一般来说，当毒物直接进入血流时（静脉内途径），反应出现最快，效应也最强烈。其他途径按效应大小的大致顺序排列，依次为吸入、腹腔内、皮下、肌肉、皮内、口服和表皮接触。溶剂或其他配方成分可能显著改变摄食、吸入或局部接触后的吸收过程。此外，给药途径也影响毒性。例如，一种肝脏解毒的物质，经口给药应该比吸入给药毒性低，或者说经门静脉（经口）比直接经体循环（吸入）给药毒性要小。

四、联合作用

一种外源化学物对机体的毒性作用，可以由于同时或先后接触另一种外源化学物而使其所表现的联合毒性比任一单一的外源化学物的毒性增强或减弱，毒理学将两种或两种以上的外源化学物对机体的交互作用称为联合作用（joint action）。联合作用又分为交互作用和非交互作用。

（一）交互作用

1. 协同作用（synergistic joint effect）　两种或两种以上外源化学物对机体所产生的毒性效应大于各个外源化学物单独对机体的毒性效应总和，即毒性增强，是为协同作用。协同作用的机制很复杂，依染毒或接触的外源化学物而定。例如，马拉硫磷与苯硫磷联合染毒，毒性明显增加，经研究可能是苯硫磷可以抑制肝脏分解马拉硫磷的酯酶，使马拉硫磷分解减慢之故。又如四氯化碳和乙醇对肝脏的作用，石棉暴露的吸烟对肺的作用。

2. 拮抗作用（antagonistic joint action）　两种或两种以上外源化学物对机体所产生的毒性效应低于各个外源化学物单独毒性效应的总和，即为拮抗作用。其机制也很复杂，包括化学性，化学性拮抗作用是指发生化学反应形成了一种毒性较低的产物，如二巯丙醇对重金属的络合作用。功能性拮抗作用发生于两种化学物质对同一生理指标有相反的作用，如中枢神经兴奋剂和抑制剂的对抗作用。竞争性拮抗是毒物和拮抗剂作用于同一受体，如神经节抑制剂可阻断尼古丁对神经节的作用。非竞争性拮抗是毒物和拮抗剂作用于不同受体，如阿托品降低胆碱酯酶. AchE 抑制剂的毒作用，阿托品并不是作用于 AchE，而是阻断胆碱能神经所支配的效应细胞的 M 胆碱受体。

3. 增强作用（potentiation joint action）或抑制作用（inhibition joint action）　一种化学物对某器官或系统并无毒性，但当加至另一种化学物时使其毒性效应增强或降低，是为加强作用或抑制作用。三氯乙烯和异丙基肾上腺素对肝脏并无作用，却都能明显地增加四氯化碳对肝脏的毒性。

（二）非交互作用

1. 相加作用（additional joint action）　两种或两种以上外源化学物其各自对机体的毒性

作用的靶相同，则其对机体所产生的毒性效应等于各个外源化学物单独对机体所产生效应的总和，此作用就是相加作用，此为剂量相加。例如，大部分刺激性气体引起的呼吸道刺激作用多呈相加作用。又如，不少有机磷农药也呈相加作用，甲拌磷大鼠经口的毒性比乙酰甲胺磷的毒性大 1 200 倍以上，但混合给大鼠染毒仍呈相加作用(可是有的有机磷农药混合后毒性增加，如马拉硫磷与稻瘟净或乐果与稻瘟净混合毒性均增加故不能一概而论)。

2. 独立作用(independent effect 或 independent joint action)　当两种或两种以上外源化学物对机体作用，其作用的部位-靶器官不同，且各靶器官或靶部位之间生理关系较为不密切，此时各外源化学物的毒性效应表现为各自的毒性效应，称为独立作用。

(洪　峰)

第四章　常规毒性测试及其替代实验

外源化学物的常规毒性(general toxicity)是指化学物以一定剂量、一定接触时间和一定接触方式下对生物体所产生的综合毒性效应的能力。常规毒性是对应于特殊毒性而言的，是化学物的基本毒性。常规毒性根据染毒时间的长短，可将产生的毒性作用分为急性毒性、亚慢性毒性和慢性毒性。在实际工作中，毒物的常规毒性作用测试是毒理学的经常性工作，是毒理学评价所依赖的主要资料来源。进入人类生态环境中和人体密切接触的物质，特别是新化学物，均需对其常规毒性进行观察和评价，如新的食品添加剂、药品、农药、工业化学品等。化学物的常规毒性测试对防治外源化学物所致的急慢性中毒、对毒理学的危险度评定和安全性评价、制定卫生标准以及管理毒理学的决策方面均具有十分重要的意义。

长期以来，毒性测试实验一直存在着几个严重的问题：通常动物染毒剂量远远高于人体实际接触剂量，导致高剂量到低剂量推导的不确定性；小数量实验动物到大量人群外推的不确定性；从单纯遗传背景的近交系实验动物中所得到的结果外推到复杂遗传背景的人群的不确定性；传统毒理学实验使用大量实验动物，耗资、耗时、耗人力，难以适应实际需求；难以研究化学物暴露和基因的交互作用；以疾病或死亡为观察终点，不能提供足够的毒作用机制的信息；常规使用成年健康的大鼠，未考虑易感的年龄阶段对毒物作用的影响，难以制定可为社会接受的安全限值。有鉴于此，2007 年美国国家研究院(NRC)发表了一份报告(toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy)，提出 21 世纪毒性测试的重点将由整体动物实验转向基于人类细胞、细胞系和(或)细胞组分等实验动物替代方法。该报告描绘了毒理学测试的最高理想是高通量、高灵敏度、低成本、预测能力强而且准确，并预言未来的毒性测试将主要依赖于体外实验和基于计算机、数学等模型的非生物学实验，而传统的动物实验将可能部分甚至全部被替代。

第一节　常规毒性及描述参数

在毒理学实验动物研究中可得到许多毒性参数指标，其作用是为了定量地描述或比较外源化学物的剂量效应关系和剂量反应关系。这些参数分为两种：①毒性上限参数，在急性毒性实验中以死亡为观察终点得到的各项毒性参数；②毒性下限参数，在急性、亚急性、亚慢性和慢性毒性实验中观察最低有害作用或最大无有害作用得到的剂量参数。

一、致死剂量或浓度

1. 绝对致死剂量　绝对致死剂量(absolute lethal dose, LD_{100})是指化学物引起受试对象全部死亡所需要的最低剂量或浓度,如再降低剂量就有存活者。但是,由于个体差异的存在,受试群体中总是有少数耐受性或高敏感性的个体,故 LD_{100} 常有很大的波动性。所以,表示一种外源化学物的毒性高低或对不同外源化学物的毒性进行比较时,一般不用绝对致死量(LD_{100}),而采用半数致死量(LD_{50})。LD_{50} 较少受个体耐受程度差异的影响,较为稳定。

2. 半数致死剂量　半数致死剂量(median lethal dose, LD_{50})指化学物引起一半受试对象出现死亡所需要的剂量,又称致死中量。LD_{50} 是评价化学物急性毒性大小最重要的参数,也是对不同化学物进行急性毒性分级的基础标准。化学物的急性毒性越大,其 LD_{50} 的数值越小。与 LD_{50} 概念相似的毒性参数,还有半数致死浓度(LC_{50}),即能使一组实验动物在经呼吸道暴露外源化学物一定时间(一般固定为 2 小时或 4 小时)后,死亡 50%所需的浓度(mg/m^3)。

LD_{50} 是一个生物学参数,受多种因素影响。对于同一种化学物,不同种属的动物敏感性不同,如异氰酸甲酯对大鼠的 LD_{50} 为 69 mg/kg,对小鼠则为 120 mg/kg。接触途径不同也可影响 LD_{50} 的值,如内吸磷对大鼠经口染毒的 LD_{50} 为 2.5 mg/kg,经皮染毒时 LD_{50} 为 8.2 mg/kg。因此,在表示 LD_{50} 时,必须注明动物种属和接触途径。对于某些化学物,同种不同性别的动物敏感性不同,如有机磷农药马拉硫磷和甲基对硫磷对雄性动物毒性大,而对硫磷和苯硫磷对雌性动物毒性大。对于这样的化学物,还应标明不同性别动物的 LD_{50}。此外,实验室环境、喂饲条件、染毒时间、受试物浓度、溶剂性质、实验者操作技术的熟练程度等均可对 LD_{50} 产生影响。据 Web 报道,用 26 种化学物对大鼠灌胃染毒,并对每种化学物 LD_{50} 的最大值和最小值进行比较,结果相差小于 2 倍者 12 种,2~2.5 倍者 8 种,2.5~3 倍者 3 种,大于 3 倍者 3 种,这说明 LD_{50} 有较大的波动性。因此,在计算 LD_{50} 时,还要求出 95%可信限,以 $LD_{50} \pm 1.96\sigma$ 来表示误差范围。在各种急性毒性分级标准中,等级间的数值一般可相差 10 倍,就是充分考虑到了 LD_{50} 的波动性。

3. 最小致死剂量　最小致死剂量(minimal lethal dose, MLD、LD_{01} 或 MLC、LC_{01})指化学物引起受试对象中的个别成员出现死亡的最小剂量或浓度。从理论上讲,低于此剂量即不能引起死亡。

4. 最大耐受剂量　最大耐受剂量(maximal tolerance dose, MTD、LD_0 或 LC_0)指化学物不引起受试对象出现死亡的最大剂量或浓度。若高于该剂量即可出现死亡。与 LD_{100} 的情况相似,LD_0 也受个体差异的影响,存在很大的波动性。

上述 LD_0 和 LD_{100} 常作为急性毒性实验中选择剂量范围的依据。

二、最低有害作用剂量

1. 阈剂量　阈剂量(threshold dose)指化学物引起受试对象中的少数个体出现某种最轻微的异常改变所需要的最低剂量,又称为最小有作用剂量(minimal effect level, MEL)。分为急性和慢性两种:急性阈剂量(acute threshold dose, Limac)为与化学物一次接触所得;慢性阈剂量(chronic threshold dose, Limch)则为长期反复多次接触所得。由于实际工作中,在哪个剂量水平才能发现化学物所致的损害作用受到所选观察指标、检测技术的灵敏度和精确性、实验设计的剂量组数以及每组受试对象数等多种因素的影响,准确地测定阈剂量是很困难的,故该概念只有理论上的意义。

2. 观察到损害作用的最低剂量(lowest observed adverse effect level, LOAEL)　在规定的接触条件下，通过实验和观察，一种物质引起机体(人或实验动物)形态、功能、生长、发育或寿命发生某种有害改变的最低剂量或浓度，此种有害改变与同一物种、品系的正常(对照)机体是可以区别的。LOAEL 是通过实验和观察得到的，是有害作用，应具有统计学意义和生物学意义。

三、最大无有害作用剂量

1. 最大无作用剂量(maximal noeffect level, MNEL)　这是指化学物在一定时间内，按一定方式与机体接触，用现代的检测方法和最灵敏的观察指标不能发现任何损害作用的最高剂量。与阈剂量一样，最大无作用剂量也不能通过实验获得。

2. 未观察到损害作用剂量(no observed adverse effect level, NOAEL)　毒理学实验能够确定的是未观察到损害作用的剂量。NOAEL 是在规定的接触条件下，通过实验和观察，与适当的对照机体比较，一种物质不引起机体任何作用(有害作用或非有害作用)的最高剂量或浓度。它是毒理学的一个重要参数，在制订化学物的安全限值时起着重要作用。

要指出的是，对于同一化学物，在使用不同种属动物、染毒方法、接触时间和观察指标时，往往会得到不同的 LOAEL 和 NOAEL。因此，在表示这两个毒性参数时应注明具体实验条件。另外，化学物的 LOAEL 和 NOAEL 不是一成不变的，随着检测手段的进步和更为敏感的观察指标的发现，这两个毒性参数也会得以更新。

四、安全剂量

1. 基准剂量(benchmark dose, BMD)　在计算参考剂量(RfD)的公式中，NOAEL 或 LOAEL 是关键参数，但它们往往受实验组数、每组实验动物数、各实验组的剂量间隔宽窄、对照组损害效应的发生率高低和实验数据的变异程度等因素的影响，准确性不高。另外，NOAEL 和 LOAEL 都只是一个实验剂量，是剂量反应关系中的一个点值，不能全面反映化学毒物有害效应的全部特征。NOAEL 或 LOAEL 相同或近似的物质，其剂量反应曲线的斜率可能不同，这就会使推导出来的 RfD 产生较大误差。

用 BMD 来替代 NOAEL 或 LOAEL 计算。RfD 可较好地解决这个问题。BMD 是一个可使化学毒物有害效应的反应率稍有升高的剂量的 95%可信限下限值。该反应率可以人为确定，通常选择 1%、5%或 10%。此时，计算 RfD 的公式为：

$$RfD = BMD/UFs \times MF$$

由 BMD 计算 RfD，较之 NOAEL 或 LOAEL 有许多优点。首先，它是依据剂量-反应关系曲线的所有数据计算获得的，而不是仅仅依据一个点值，在可靠性与准确性上都大大提高了；其次，BMD 要计算反应剂量 95%可信限的下限值，就需要把实验组数、每组实验动物数以及终点指标观察值的离散度等均考虑在内。如果资料的质量不高(每组受试对象少或反应的变异大)，则可信限会很宽，BMD 也相应降低，反映出有较大的不确定性存在；反之亦然。再有，对于未直接观察到 NOAEL 的实验结果，仍可通过计算求出 BMD。BMD 既可通过分组的计数资料获得，也可通过连续的计量资料获得，故应用范围更为广泛。

2. 安全限值和接触界限　安全限值即卫生标准，是对各种环境介质(空气、土壤、水、食品等)中的化学、物理和生物有害因素规定的限量要求，在低于此种浓度和接触时间内，根据现有

的知识，不会观察到任何直接和(或)间接的有害作用。也就是说，在低于此种浓度和接触时间内，对个体或群体健康的危险是可忽略的。制定安全限值的前提是必须从动物实验或人群调查得到 LOAEL 或 NOAEL。安全限值可以是每日容许摄入量(ADI)、可耐受摄入量(TI)、参考剂量(RfD)、参考浓度(RfC)和最高容许浓度(MAC)等。

对毒效应无可确定阈值的化学物，根据定义，对无阈值的外源化学物在零以上的任何剂量，都存在某种程度的危险度。这样，对于遗传毒性致癌物和致突变物就不能利用安全限值的概念，只能引入实际安全剂量(virtual safety dose, VSD)的概念。化学致癌物的 VSD，是指低于此剂量能以 99%可信限的水平使超额癌症发生率低于 10^{-6}，即 100 万人中癌症超额发生低于 1 人。

3. *每日容许摄入量* 每日容许摄入量(acceptable daily intake, ADI)指允许正常成人每日由外环境摄入体内的特定化学物的总量。在此剂量下，终生每日摄入该化学物不会对人体健康造成任何可测量出的危害，单位用 mg/(kg・bw)表示。

4. *参考剂量或参考浓度* 参考剂量(reference dose, RfD)由美国环境保护局(EPA)首先提出，用于非致癌物质的危险度评价。RfD 为环境介质(空气、水、土壤、食品等)中化学物的日平均接触剂量的估计值。人群(包括敏感亚群)在终生接触该剂量水平化学物的条件下，预期一生中发生非致癌或非致突变有害效应的危险度可低至不能检出的程度。

第二节　经典实验方法

一、急性毒性

急性毒性实验是了解外源化学物对机体产生急性毒性的主要依据，是毒理学研究中最基础的工作。不同机构对不同种类的外源化学物所提出的急性毒性实验的程序和要求可能有所不同，但基本原则一致。

(一) 急性毒性的概念

急性毒性(acute toxicity)是指机体(实验动物或人)一次或 24 h 内多次接触外源化学物后在短期内所产生的毒性效应，包括一般行为和外观改变、大体形态变化以及死亡效应。

关于急性毒性概念中的一次或 24 小时多次接触中的“一次”，在经口、注射途径染毒时是指瞬间给予实验动物毒物，在经呼吸道与经皮肤染毒时则是指在一段规定的时间内使实验动物持续接触毒物的过程；而“多次”的概念是指，当外源化学物毒性很低，即使一次给予实验动物最大染毒剂量后仍无法观察到明显的毒效应，还不能达到充分了解该毒物急性毒性作用的目的，从而在 24 h 内分次染毒以达到规定的限制剂量，即为“多次”。

急性毒性效应一般是指机体接触化学物后，在较短时间内观察到的毒性症状。有的化学物在实验动物接触数分钟内即可产生严重中毒症状，甚至瞬间死亡；而有些化学物几天、十几天后动物才产生明显的中毒症状和死亡，呈现迟发毒效应和死亡。有的化学物进入机体后很快出现剧烈的毒效应，并且快速恢复；有的化学物早期仅有轻微症状并很快恢复，但在几天后又出现严重中毒症状甚至死亡。因此，不能仅以接触毒物后毒性症状出现的时间来判定该毒物的某种毒性效应是否属于急性毒性，而应以接触毒物的时间，即急性毒性定义中所规定的“一次”或“24 h 内多次”接触后所产生的毒性效应。在实际工作中，大部分毒物的急性毒性症

状在短期内出现，许多毒理学安全性评价程序中对急性毒性的观察时间一般规定为7～14天，如有必要也可延长至14天以上。

为了观察到明确的急性毒性作用，通常给实验动物一次性大剂量染毒，染毒后所表现出的一般行为、外观、大体形态的改变常常十分明显，中毒症状严重，常发生死亡。

（二）急性毒性实验的目的

急性毒性实验是认识和研究外源化学物对机体毒效应的起始阶段，可以提供短期接触毒物所致毒作用的许多信息和资料，归纳起来实验目的有如下4个方面。

（1）测试和求出毒物的致死剂量以及其他急性毒性参数，通常以LD_{50}或LC_{50}为最主要的参数，并以此划分其急性毒性的分级。

（2）通过观察受试动物中毒表现、毒作用强度和死亡情况等，初步评价毒物对机体的毒效应特征、靶器官、剂量-反应（效应）关系，并预测其对人体产生损害的危险性。

（3）为研究受试毒物的亚慢性、慢性毒性以及其他毒理实验染毒剂量和观察指标的选择提供依据。

（4）为研究受试毒物毒作用机制提供线索。

通过外源化学物的急性毒性实验，可以得到一系列毒性参数，包括外源化学物4种急性毒性上限参数：绝对致死剂量或浓度（LD_{100}或LC_{100}），半数致死剂量或浓度（LD_{50}或LC_{50}），最小致死剂量或浓度（MLD，LD_{01}或MLC，LC_{01}），最大非致死剂量或浓度（MNLD或LD_0或LC_0），这些参数是以死亡为终点的。另外，还可以得到以非致死急性毒性为终点的毒性下限参数：NOAEL和LOAEL。

（三）急性毒性设计原则

急性毒性实验应用很广，尤其对于和人类生活密切接触的化学物，如新的食品添加剂、药品、农药、化妆品、工业毒物等的毒理学安全性评价，通常是必做的实验，这是评估毒性大小的第一步工作。虽然急性毒性实验的程序（如食品、农药、化妆品、药物毒理学安全性评价程序）在国内外众多法令中有不同的规定，但总体实验设计原则是相似的，即要保证随机、均衡和重复的原则，主要包括实验动物的选择、染毒途径、染毒剂量、观察周期、观察指标的选择、计算方法和评价等。

1\. *实验动物的选择*　尽量选择急性毒性反应与人近似的动物；选择易于饲养管理，实验操作方便，繁殖生育力强，数量较大能保障供应，价格较低，易于获得的动物。在选择实验动物时要考虑到动物的物种品系、年龄、体重、数量。在法规性毒理学评价工作中，必须按照其规范要求进行实验动物的选择，而在基础性研究工作中应按科研课题的具体设计进行选择。如采用经口途径染毒，实验动物胃肠道内食物的残留会对化学物的毒性产生一定的干扰，因此在实验给药前应作禁食处理。

从充分暴露药物毒性的角度考虑，在首次应用于人之前，应从啮齿类和非啮齿类动物中获得较为充分的安全性信息。实验所选用的动物数，应根据动物的种属和实验目的来确定。通常使用3～5个剂量组（其中包括阴性对照组），每组的动物数，一般小动物数目相对多于大动物（如啮齿类动物每性别不少于5只，非啮齿类动物不少于2只）。基本要求就是在获得尽量多信息的前提下，使用尽量少的动物数。

2\. *染毒方式*　急性毒性实验染毒途径的选择应考虑几方面因素：模拟人在生活和生产环境中实际接触该受试物的途径和方式，有利于不同化学物之间急性毒性大小的比较；受试物的

性质和用途;各种受试物毒性评价程序的要求等。最常用的染毒途径为经口、经呼吸道、经皮及注射途径。不同染毒途径对受试物急性毒性的大小影响很大,通常取决于不同途径的吸收量和吸收速率。吸收速率依次排列,一般是静脉注射>吸入>肌内注射>腹腔注射>皮下注射>经口>皮内注射>经皮。

3. *剂量选择* 测试一个新化学物的急性毒性和 LD_{50},在设计剂量之前,首先要了解受试物的化学结构式,确定其属于哪一类已知化合物(或衍生物),了解其有何特殊基团、分子量、常温常压下的状态、溶解度、挥发度、水溶性、脂溶性、pH 值、比重等理化性质,以及其生产批号、纯度、杂质成分与含量等。然后根据该受试物的特点、研究目的和法规要求,确定用何种方法设计实验和计算 LD_{50} 值,以确定剂量分组。也可通过查阅文献找到与受试物化学结构与理化性质相近似的化学物毒性资料,比较采用相同或相近动物种类、染毒途径的 LD_{50} 值,或预期毒性剂量范围作为参考选择预实验剂量。每个剂量组间的组距可大些,以便寻找出受试物的致死剂量范围。

剂量选择是急性毒性实验成功的基础,也是能否以较少的动物消耗尽快得到准确的急性毒性参数的前提。总的原则是先用少量动物,以较大的剂量间隔染毒,找出 10%～90%(或 0%～100%)的致死剂量范围,然后即可设计正式实验的剂量和分组。剂量组数需根据实验设计所选用的 LD_{50} 计算方法来确定,如寇氏法或 Bliss 法一般设 5～8 个剂量组,霍恩法设 4 个剂量组。

可根据以下公式计算各组剂量:

$$i = [\lg(LD_{90} - LD_{10})]/(n-1) \text{ 或 } i = [\lg(LD_{100} - LD_{0})]/(n-1)$$

式中,i 为组距,即相邻的两个剂量组对数剂量之差,n 为设计的剂量组数。

求得 i 值后,以最低剂量值的对数剂量加上一个 i 值,即是第 2 个剂量组的对数剂量,以此类推直至最高剂量组,查各自的反对数即可得出各组剂量的值。霍恩法可根据剂量选择表,选择连续的 4～5 个剂量组。

有的化学物在急性毒性实验中当给以高剂量达到 5 000 mg/kg 时,实验动物仍无明显毒性体征,或虽有毒性体征但仍无死亡,此时一般可不再加大剂量进行实验。

急性毒性实验除设立几个剂量组外,对是否设正常和溶剂对照组也有不同意见。由于所用溶剂均为常见试剂,因此在实际工作中,除有特殊规定外均不设立对照组。

4. *毒作用的观察* 急性毒性实验不应简单地理解为 LD_{50} 的测定,实际上急性毒性实验的内涵和目的是很丰富的。在急性毒性实验过程中,要全面观察动物的各种反应和变化,仔细分析实验动物在染毒后出现的中毒表现、剂量效应、时间分布等,这对于了解新化学物的毒性作用特征,获取尽可能多的毒性信息非常重要,可以补充只以 LD_{50} 表示急性毒性的不足。

急性毒性实验的观察和记录内容主要包括 4 个方面:中毒体征及发生过程、死亡情况和时间分布、体重和病理形态学变化。

(1) 中毒体征及发生过程:应详细观察和记录动物出现的中毒症状、发生时间和症状发展的经过。机体对毒物作用的反应可以表现出各个系统的特征,不同系统的毒性表现可不一样,也有一些中毒体征和行为的改变是多个系统毒性共同反应的表现,可通过观察到的毒性表现,初步确定该受试物的急性毒性靶器官。实验动物的毒性表现有一些规律,许多动物染毒后,往往出现兴奋—抑制—死亡,或者抑制—死亡的现象。高剂量组实验动物染毒后中毒体征急剧

发展，常来不及从容观察，动物很快出现死亡。不同的化学物引起的具体毒性表现常有所不同，正是这种不同可提供毒性机制的信息。

(2) 死亡情况和时间分布：急性毒性实验中实验动物的死亡数是计算 LD_{50} 值的依据，动物死亡数量每增加或减少一只都会对 LD_{50} 值产生明显影响。分析中毒死亡时间的分布规律，也可以提供重要信息。例如，久效磷给小鼠经口与腹腔注射染毒，均呈现出随着染毒剂量增加，死亡时间缩短的现象，两者呈直线负相关，这提示实验动物致死原因是化学物原形所致。而过氧化二磷酸二环己酯给大鼠腹腔注射后，染毒剂量对数值与死亡时间呈现明显的负相关关系，但给小鼠腹腔注射后，染毒剂量与死亡时间无明显相关，这提示可能与该化学物在大鼠和小鼠体内代谢不同有关。

(3) 体重：实验动物体重变化指标，可以反映动物中毒后整体的综合性变化，是一个比较客观简便的量化指标。因此，在观察实验动物中毒体征的同时，对存活动物应定期多次称量体重的变化，一般为每周 1～2 次。体重降低或增长缓慢的原因是多方面的，如毒物影响了食欲或消化系统的功能受累而厌食或拒食，可以使体重改变；毒物影响食物的吸收和利用，也能导致体重变化；此外，水的摄取受到影响或肾功能急性损伤，也可能在体重上有反映。

(4) 病理检查等：急性毒性实验中，对死亡动物应及时进行大体解剖，肉眼观察大体病理变化（如脏器外观、大小、色泽的变化以及有无充血、出血、水肿或其他改变），如有改变须取材进一步做组织病理学检查。对存活动物在观察期结束时也应进行解剖检查，必要时做组织病理学检查。

急性毒性实验中，根据需要可进一步扩大观察项目，如体温、心电图、某些生化指标的测定。

急性毒性实验观察周期一般为 14 天，给药当天应连续或多次观察，观察的间隔和频率应适度，以后可根据情况每天 2 次或多次观察，直到实验周期结束。不同的化学物其中毒体征出现的时间和特点各有不同，而且引起动物死亡的时间也存在很大的个体差异，有些化学物染毒后迅速引发中毒体征并致动物死亡，染毒后应即刻开始观察动物的中毒表现和死亡情况；而有些化学物质中毒症状发生迟缓，甚至出现症状暂时缓解，但 2～3 天后甚至更迟些又出现明显的中毒症状。此外，有些化学物质对不同个体的毒作用也存在明显的差异。

5. 半数致死量 LD_{50} 的确定　LD_{50} 的计算方法很多，最常用的是改良的寇氏法，又称 Karber 法。该法利用剂量对数与死亡率呈 S 形曲线的特征进行 LD_{50} 及其 95%可信区间的估计。本法要求设定 5～6 个剂量组，各剂量组的组距呈等比级数，每组实验动物数相等（一般为 10 只），并要求死亡率呈近似正态分布，最低剂量组的死亡率＜20%，最高剂量组的死亡率＞80%。

计算公式：

$$\lg LD_{50} = Dm - i(\Sigma p - 0.5)$$

$$S_{\lg LD_{50}} = i\sqrt{\Sigma \frac{pq}{n}}$$

LD_{50} 的 95%可信区间为 $\lg^{-1}(\lg LD_{50} \pm 1.96 s_{LD_{50}})$。

式中：Dm 为最大剂量的对数值，i 为相邻两个剂量组剂量对数的差值，p 为各组死亡率，q 为各组存活率，Σp 为各剂量组死亡率的总和，n 为每组动物数。

另外，霍恩(Horn)法在实践中也较常用，该法利用剂量对数与死亡率的转换数(即概率单位)呈直线关系，又称平均移动法或剂量递增法。相对于寇氏法，霍恩法使用的动物数较少，可依据剂量设计表的剂量设计和实验动物死亡数量，直接查得 LD_{50} 值及其 95%可信区间，方法较为简便。但是，其 LD_{50} 的 95%可信区间范围较宽，方法的精确度较低。

6. *半数致死量 LD_{50} 的应用及急性毒性实验的局限性* 半数致死量 LD_{50} 值的应用主要有以下 4 个方面：①通过 LD_{50} 值对化学物进行急性毒性分级；②评价化学物的急性毒性强弱；③比较化学物的急性毒性大小；④为其他毒理学实验提供剂量参考。

通过经典的急性毒性实验虽然可以获得有关化学物毒性的重要数据 LD_{50}，但在实践中仍有一定的局限性：①实验消耗的动物数量较大，按经典方法的要求测定化学物的 LD_{50}，一次完整实验需要 60～100 只动物，不同实验方法的设计对动物的数量要求不同，如使用大鼠或小鼠，数量一般都在 20 只以上，造成了不必要的动物和资源的浪费，受到伦理学界和科学界的广泛批评。②实验所获得的信息有限，LD_{50} 的值不能等同于急性毒性，死亡仅仅是评价急性毒性的许多观察指标之一。化学物单次大剂量急性中毒，动物大多死于中枢神经系统及心血管功能障碍，不能显示出不同化学物的毒作用特征，并且由于实验动物死亡迅速，各种器质性变化尚未发展，不能显示出靶器官的病变。③测得的 LD_{50} 仅仅是一个近似值，依赖于多种内部和外部因素，95%可信区间较宽，尤其是经口 LD_{50} 的波动较大，并且常带有实验室间的差异，给化学物的毒性分级带来一定的困扰。④应用 LD_{50} 进行安全性评价，仅评价动物死亡和简单的症状观察是不够的，更需要的是生理学、血液学及其他化验检查所提供的深入细致的毒性信息。⑤人和动物对药物的敏感性差别很大，不能期望使用急性毒性实验的结果来拟定人的临床剂量，且对于新药开发来说，通常没有必要求出精确的 LD_{50} 值，所要关注的是动物出现的毒性和剂量间的量效关系。

(四) 化学物的急性毒性分级

通过急性毒性实验获得的 LD_{50} 值，其最主要的应用是用于急性毒性分级。联合国世界卫生组织(WHO)推荐了一个五级标准(表 4-1)。我国在 1995 年颁布实施的国家标准《农药登记毒理学试验方法》中提出农药急性毒性分级标准(表 4-2)。1994 年颁布实施的《食品安全性毒理学评价程序和方法》中提出急性毒性分级的六级标准(表 4-3)。按急性毒性分级标准评价毒性大小是一种相对粗略的分级方法，根据 LD_{50} 参考这个标准将毒物急性毒性作大体上的分级。

表 4-1 WHO 急性毒性分级

毒性分级	大鼠一次经口 LD_{50} (mg/kg)	6 只大鼠吸入 4 h 死亡 2～4 只的浓度(ppm)	兔经皮 LD_{50} (mg/kg)	对人可能的致死剂量	
				g/kg	总量(g/kg)
剧毒	<1	<10	<5	<0.05	0.1
高毒	1～	10～	5～	0.05～	3
中等毒	50～	100～	44～	0.5～	30
低毒	500～	1 000～	350～	5～	250
实际无毒	5 000～	10 000～	2 180～	>15	>1 000

(引自《WHO 化学物急性毒性分级标准》，1977)

表 4-2　我国农药的急性毒性分级

毒性分级	大鼠经口 LD_{50}(mg/kg)	大鼠经皮 LD_{50}(mg/kg)4 h	大鼠吸入 LC_{50}(mg/m^3)2 h
剧毒	≤5	≤20	≤20
高毒	5～50	20～200	20～200
中等毒	50～500	200～2 000	200～2 000
低毒	500～5 000	2 000～5 000	2 000～5 000
微毒	>5 000	>2 000	>2 000

(引自《农药登记资料要求》,2001)

表 4-3　我国食品安全性毒理学评价程序的急性毒性分级

级别	大鼠经口 LD_{50}(mg/kg)	相当于人的致死剂量	
		mg/kg	g/人
极毒	<1	稍尝	0.05
高毒	1～50	500～4 000	0.5
中等毒	51～500	4 000～30 000	5
低毒	501～5 000	30 000～250 000	50
实际无毒	5 001～15 000	250 000～500 000	500
无毒	>15 000	>500 000	2 500

(引自《食品安全性毒理学评价程序和方法》,GB 151932003)

不论何种急性毒性的分级标准都存在不少的缺点和不足,实际应用中应注意急性毒性实验结束时,除报告该毒物的 LD_{50} 值和急性毒性级别外,还应对中毒和死亡特征加以报告。依据 LD_{50} 进行化学物的急性毒性分级只能作为急性毒性评价的依据之一,不应作为唯一的指标。

二、亚慢性毒性

(一) 亚慢性毒性的概念

亚慢性毒性(subchronic toxicity)是指实验动物或人较长期连续重复接触外源化学物所产生的中毒效应。所谓"较长期"是相对于急性、慢性毒性而言,并没有统一的、严格的时间界限,通常为 1～3 个月。

(二) 亚慢性毒性实验的目的

亚慢性毒性实验以化学物连续反复的染毒、比较充分而适当的接触时间、较大的剂量范围和广泛深入的检测为特点,可以观察受试物在实验动物体内所产生的生物学效应,获得较丰富的毒理学信息。亚慢性毒性实验的目的有以下 5 个方面。

(1) 研究受试物亚慢性毒性剂量-反应(效应)关系,确定未观察到有害作用的剂量(NOAEL)和观察到有害作用的最低剂量(LOAEL),提出安全限量参考值。

(2) 观察受试物亚慢性毒性效应谱、毒作用特点和毒作用靶器官。

(3) 观察受试物亚慢性毒性作用的可逆性。

(4) 为慢性毒理实验的剂量设计和观察指标选择提供依据。

(5) 为在其他实验(急性、亚急性、其他动物物种的亚慢性实验等)中发现的或未发现的毒作用提供新的信息，比较不同动物物种毒效应的差异，为受试物毒性机制研究和将研究结果外推到人提供依据。

(三) 亚慢性毒性实验设计原则

1. *实验动物的选择和要求* 亚慢性毒性实验一般要求选择两种实验动物，一种是啮齿类，一种是非啮齿类。从理论上说亚慢性毒性实验选择的实验动物应是对受试物的生物转化、生理生化、毒性反应与人类相当或相似的物种，但是在实际工作中往往不易满足。基本上均使用大鼠和犬，有时选用猴，这取决于受试物的重要性和实验条件。亚慢性经皮毒性实验，可用兔或豚鼠。实验动物品系多用纯系动物，大鼠常用 Wister 和 SpraqueDawley。

亚慢性毒性实验一般要求选用两种性别，每组雌雄各半。特殊情况下如研究某种受试物的性腺毒性或生殖毒性，可选用单性别的动物。一般选择刚断乳不久的动物，大鼠 6～8 周龄(体重 80～100 g)。同组动物体重相差不应超过平均体重的 10%，组间平均体重不超过 5%。大鼠、小鼠每组不少于 20 只，犬、猴每组不少于 6 只。若实验要求在实验中期处死部分动物作中期检测，则每组动物数量要相应增加。对照组和剂量组动物数应相同，体重(年龄)一致。

亚慢性毒性实验周期较长，观察指标较多，实验动物的质量、喂饲条件和实验环境明显影响受试物的毒性反应。应尽可能使用高等级实验动物，在符合国家实验动物标准的实验环境中进行，使用清洁级及以上等级的大小鼠，并饲养在屏障环境内进行实验。

2. *染毒方式* 亚慢性毒性实验染毒途径的选择主要考虑两点：①应当尽量选择和人类接触途径相似的方式；②应当与预期进行的慢性毒作用研究的接触途径相一致。一般以经口、经呼吸道和经皮染毒为多。染毒频率通常每日一次，连续给予，如实验期为 3 个月或超过 3 个月时，也可每周 6 次。经口染毒途径常采用灌胃法、喂饲法、胶囊法。经呼吸道染毒的时间通常为每日 2～6 h，根据设计需要可缩短或延长。工业毒物可以缩短至 1 h，环境污染物可延长至 8 h。在进行亚慢性毒性实验时，最好结合毒代动力学血外源化学物浓度的监测。为了维持实验动物体液中有一个准确的血外源化学物浓度水平，保持受试物生物学效应的每日相似性，亚慢性毒性实验每日染毒的时间应保持一致，一般在每日上午进行，给药后喂食。

3. *剂量选择和分组* 在亚慢性毒性实验的设计中，染毒剂量的选择是最重要的和最难的问题之一。为了得出准确的剂量反应关系，充分观察受试物亚慢性毒性作用，一般至少应设 3 个剂量组和 1 个阴性(溶剂)对照组。高剂量组应能引起明显的毒性或少量动物的死亡(少于 10%)，低剂量组应无中毒反应，相当于未观察到有害作用剂量(NOAEL)，高低剂量组间设置 1 个中剂量组，比较理想的中剂量组约相当于观察到有害作用的最低剂量(LOAEL)。通常可根据两个参数确定高剂量，急性毒性的阈剂量，或 1/5～1/20 的 LD_{50} 剂量。高、中、低剂量组距以 3～10 倍为宜，一般不少于 2 倍。

4. *毒作用的观察* 对经外源化学物染毒后的实验动物进行全面、系统、深入的观察检测是亚慢性毒性实验必做的工作，检查的时间包括实验过程中、染毒结束时，有些情况下，还需在染毒前和染毒结束后的恢复期做检查。检查的项目包括一般性指标、实验室指标、系统尸解和组织病理学检查、其他特殊指标检查。

(1) 一般性指标：主要指外观体征和行为活动、粪便性状、食量及体重变化等，常常能综合反映毒物对机体的毒作用，往往是敏感的综合毒效应指标。

1) 外观体征、行为活动：每日观察实验动物出现的外观体征和行为改变，记录各体征出现

的时间和先后次序，包括食欲、活动、被毛、分泌物、排泄物、呼吸等，尤其要留意动物被毛的光洁度与色泽、眼分泌物、呼吸、神态、行为等。这些资料有助于分析化学物损害机体的部位及程度。

2）动物体重：动物体重是一个相当重要且比较敏感、客观的指标，反映了受试物对实验动物的生长发育及一般状态的影响。与对照组处于相同的喂饲条件下，如果受试组动物体重增长比对照组低 10%，可以提示是由受试物引起的毒效应，如果各剂量组体重增长改变有剂量反应关系，则可以肯定是一种毒性效应。一般每周称重一次，3 个月以后也可每 2 周称重一次。

3）饲料消耗量：亚慢性实验期间必须每周观察并记录动物的饲料消耗量，并计算食物利用率。在经喂饲法染毒时，可计算各组动物实际染毒剂量。比较各染毒组与对照组动物的食物利用率，有助于了解化学物的毒性效应，尤其将体重指标和食物利用率结合起来分析。如果受试物影响食欲，则每日进食量减少，体重增长会受影响，但食物利用率不一定改变。如果受试物干扰了食物的吸收或代谢，虽然不一定影响食欲，但体重增长却减慢，因而食物利用率也会有改变。

(2) 实验室检查：通常包括血常规、尿常规和血液生化指标检测，在亚慢性毒性实验中，这是非常重要不可缺少的检查。血、尿等体液的实验室检查目的是发现受试物所致的器官损伤和功能紊乱，体内生化转化和排泄的重要器官肝脏和肾脏的功能是检查重点，血液是另一个重要的靶器官。

(3) 系统尸解和组织病理学检查：实验结束时，处死实验动物作系统解剖，进行详细的肉眼检查，测定脏器重量并作组织病理学检查。在实验中间死亡或处于濒死状态的动物，亦应作及时的系统尸解和病理学检查。

1）脏器重量和脏器系数：一般称取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、卵巢或睾丸、脑等脏器湿重，并计算其脏器系数。该指标比较适用于实质性脏器。若某脏器的脏器系数增大或减小，则反映该脏器的肿大或缩小，如增生、充血、水肿、萎缩等变化。

2）病理学检查：组织病理学检查是亚慢性毒性实验中最重要的检测指标之一，目的是确定化学物对机体毒作用的靶部位、损害的性质和程度，从病理学角度寻找化学物与病理改变的剂量效应关系，为了解化学物的毒效应及其机制提供依据。病理学检查包括大体检查、常规组织病理学检查、酶组织化学检查、免疫组织化学检查、细胞超微结构检查等，分别从大体、组织、细胞、亚细胞，甚至分子水平等多个方面发现化学物的毒效应。

(4) 其他指标的检查：在亚慢性毒性实验中，除了上述通常的检查指标外，常根据受试物毒性资料、实验中的观察和受试物的结构等线索增加一些检查项目。如果推测受试物可能对心血管系统有毒性，可进行心电图、血压、眼底检测；对神经系统有影响，可进行神经行为、神经反射等检查；对电解质、微量元素代谢有毒作用，则检测血钙、血磷等含量；还可增加眼科、骨髓象等检查。

三、慢性毒性

（一）慢性毒性的概念

慢性毒性(chronic toxicity)是指实验动物或人长期(甚至终身)反复接触外源化学物所产生的毒性效应。所谓“长期”，一般是指 2 年。对大鼠相当于终身染毒，对兔相当于生命期的 36%，对犬相当于生命期的 20%，对猴相当于生命期的 13%。

（二）慢性毒性实验的目的

（1）研究慢性毒性剂量-反应（效应）关系，确定长期接触造成有害作用的最低剂量（LOAEL）或阈剂量和未造成有害作用的剂量（NOAEL），为制定人类接触时的安全限量标准，如最高容许浓度（MAC）和每日容许摄入量（ADI），以及危险度评价提供毒理学依据。

（2）观察慢性毒性效应谱、毒作用特点和毒作用靶器官。

（3）观察慢性毒性作用的可逆性。

（4）为毒性机制研究和将毒性研究结果外推到人提供依据。

（三）慢性毒性实验的设计原则

1. *实验动物的选择和要求*　慢性毒性实验选择实验动物的原则与亚慢性毒性实验相同，应使用两种哺乳动物。实际工作中多用大鼠、犬和猴，经皮染毒也可使用豚鼠和家兔。动物数量要明显多于亚慢性实验，每组大鼠 40～60 只，犬 8～12 只，雌雄各半。如在实验过程需要分批处死部分动物时，则应适当增加每组的动物数。实验结束时每个剂量组每个性别的啮齿类动物数不少于 10 只，非啮齿类不少于 4 只。慢性毒性实验周期长，故应选择年龄较小的动物，一般选初断奶的动物，即小鼠出生后 3 周（体重 10～15 g），大鼠出生 3～4 周（体重 50～70 g），犬一般在 4～6 月龄时开始实验。

2. *染毒方法*　从理论上来说，染毒途径应选择和人类实际接触相似的途径，但在长达 2 年多的慢性实验中有些染毒途径很难进行，实际工作中多采用经口染毒，一般每周染毒 5～6 天。根据需要也可经皮肤染毒和经呼吸道染毒。慢性毒性实验动物染毒的期限究竟以多长为宜，应根据实验具体要求和所选用的动物物种而定。研究工业毒物一般认为染毒 6 个月或更长时间，环境毒物与食品的慢性毒性实验染毒期则要求 1 年以上或 2 年，也有学者主张动物终身染毒，这样求得的阈剂量或 LOAEL 和 NOAEL 更能准确反映化学物的慢性毒性作用。

3. *剂量选择和分组*　慢性毒性实验一般设 3 个染毒剂量组和 1 个对照组，必要时另设 1 个阴性（溶剂）对照组。一般认为以亚慢性毒性实验的 LOAEL 确定染毒剂量，以其 1/5～1/2 为高剂量组，以 1/50～1/10 为中剂量组，1/100 为低剂量组。如果无亚慢性实验资料，可以参照 LD_{50} 值设计剂量，如以 1/10 LD_{50} 为高剂量组，1/100 为中剂量组，1/1 000 为低剂量组。各染毒剂量组之间的剂量间距应当大一些，组间剂量差一般以 5～10 倍为宜，最低不小于 2 倍。

慢性毒性实验由于周期长，人力、物力、财力消耗很大，如果剂量设计不合理极易造成慢性毒性实验失败和结果不理想。合理的剂量设计应能得到如下结果：足够高的剂量能观察到受试物的毒性作用，阐明毒性靶器官，同时实验能顺利进行；有明确的剂量-反应关系，得到理想的 LOAEL 和 NOAEL。

4. *毒作用的观察*　慢性毒性实验的观察和亚慢性毒性实验相似，亦需进行一般性指标、实验室检查、病理学检查及其他特异性指标 4 个方面的检查，每个方面观察指标的选择应更多更全面。以亚慢性毒性实验所提供的毒效应和靶器官为基础，重点观察在亚慢性毒性实验中已经显现的阳性指标。优先采用亚慢性毒性实验筛选出来的敏感指标或特异性指标。在慢性毒性实验中，组织病理学检查是非常重要和必不可少的，是最客观和最有说服力的指标。

慢性毒性实验的时间长、代价高，必须给予特别的关注。实验过程中动物容易发生自发性疾病，干扰实验结果；实验人员出现操作错误的可能性较大；检测仪器和试剂的变化不易控制；长期低剂量染毒，实验动物处在不断损伤、不断适应和恢复的过程中；观察指标的变化程度较小，变化规律复杂。为确保实验的顺利进行，保证实验结果的准确性和可信性，必须严格规范

所有实验条件，在符合国家实验动物标准的环境中进行，全过程实施严格的质量控制，重视实验前和对照组的检测，实验全过程在优良实验室规范下进行，贯彻和执行 GLP（good laboratory practice）的要求。

第三节　替代实验

使用正常动物的实验在毒理学研究的应用中存在着不敏感、周期长、所需受试物样品多、所需实验动物量大、难以揭示毒作用位点和毒作用机制以及结果可靠性差等问题；而模型动物也存在着制造价格昂贵、受世界动物保护法限制等不足之处。因此，在“3R”原则的指导下，一些发达国家率先开展了替代方法的研究。目前体外替代方法的研究已成为实用性毒理学领域研究的新方向，主要包括离体器官实验和体外细胞培养实验。这类方法的应用一方面解决了整体动物实验中大量使用实验动物且以动物濒死或死亡为终点的伦理问题，另一方面增加了实验过程中的可控因素，提升了实验结果的可靠性。

始于 100 多年前的实验动物学是近现代生命科学的支撑和基础，实验动物为人类文明的发展和社会的进步做出了重要的贡献。1959 年，英国动物学家 William Russell 和微生物学家 Rex Burch 在《人道动物实验原理》一书中提出了著名的“3R”人道主义试验原则，即替代（Replacement）、减少（Reduction）和优化（Refinement）。近 20 年来，随着动物福利运动及现代科学技术的推动，3R 理念已逐渐成为生命科学研究中遵循的重要原则。随着细胞培养、低等生物筛查技术、分子生物学、组学技术（基因组、转录组、蛋白质组、代谢组）、组织工程技术、干细胞技术、生物标记技术、图像分析、高通量实验、计算机模拟技术等生物科学技术的发展，为替代实验的实施提供了技术支撑。2007 年，美国国立卫生研究院（NRC）描绘了具有划时代意义的“21 世纪的毒理学观念和策略”，提出了毒理学应当由原来的体内动物研究向体外实验转变，NIH 前主任 Elias Zerhouni 评论到“动物实验并不会在旦夕之间消失，但是各研究机构的工作预示着其终结的开始”。

欧洲替代方法验证中心（European centre for the validation of alternative methods, ECVAM）完成验证的已获 OECD 认可并颁布试验指南的替代方法主要涉及急性毒性实验、局部毒性实验、发育毒性实验、遗传毒性实验 4 个领域。传统的急性毒性实验主要有 3 种替代方法，即急性毒性分类法、固定计量法和上下法，可有效减少实验动物的使用，有着巨大的应用价值和发展前景。固定计量法不以死亡为观察终点，而以明显的毒性体征作为终点进行评价；动物数的使用只有传统 LD_{50} 方法的 61%，缺陷是与 LD_{50} 方法比较，仍有约 20% 的结果无法匹配。上下法，又称阶梯法、序贯法，其优势是节省实验动物，同时，不但可以进行毒性表现的观察，还能估算 LD_{50} 及其可信限，适合于能引起动物快速死亡的受试物。上下法分为限度实验和主实验，限度实验主要用于有资料提示受试物毒性可能较小的情况，主实验用于相关毒性资料很少或没有，或预期受试物有毒性时。上下法仅需实验动物 5 只，且效能与固定计量法接近，但仍以死亡为观察终点，且实验要求分阶段进行，比较耗时，无法像传统方法那样提供剂量-效应曲线的数据，只适合于评价那些染毒后动物在 48 h 内出现毒性症状并死亡的化学物质的急性毒性。此外，急性毒性的替代方法还有探针剂量法、累积剂量设计法、近似致死剂量法、限量试验等。

皮肤刺激/腐蚀性实验、皮肤光毒性实验、眼刺激/腐蚀性实验是评价化学物质局部毒性的

主要实验。这三类实验中经典的评价方法多采用家兔、豚鼠作为实验动物。皮肤或眼刺激/腐蚀性实验分为一次染毒或重复染毒实验，现有的替代方法仅能用于一次急性作用的研究，对于重复染毒后的刺激作用及可逆性的刺激变化过程则无法观察，虽然这类模型正在研发中，但现阶段仍然需要动物实验的数据与经验予以客观评价。整体动物实验用于局部毒性的评价不可避免地引起动物皮肤或眼部角膜严重不适和痛苦，因此皮肤刺激/腐蚀性实验的替代方法主要是运用人工皮肤模型，现在这些人工皮肤已实现商品化，如 EPISKIN™（EPISKINC）、EpiDerm™（MatTek）、SkinEthic™（SkinEthic）、EST - 1000™（Cell Systems 公司）等，这 4 种皮肤模型均已纳入 OECD431。皮肤光毒性实验的替代方法中，3T3 中性红摄取光毒性实验（3T3 - NRU - PT）是测试急性光毒性的核心测试法，也是欧盟法规要求的光毒性测试的唯一方法，欧盟已完全弃用动物实验来进行皮肤光毒性的评价，但由于该法的缺陷在于无法提供光毒性机制的信息，且该法使用的是 Balb/C 小鼠的成纤维细胞系，对紫外线的敏感性较人体或动物的角质细胞更高，故需要与另外两种替代方法结合来完整评估受试物质，分别是联合血红细胞光毒性测试（RBC - PT）与人体三维皮肤模型的体外光毒性测试（H3D - PT）方法。RBC - PT 不是独立方法，但能获得光毒性机制信息；H3D - PT 方法可用 3 种类型的皮肤模型进行实验，包括真皮模型、表皮模型和全层皮肤模型，后两种包含角质细胞，细胞类型较 3T3 - NRU - PT 丰富，此法主要用途是验证 3T3 - NRU - PT 的阳性结果。眼刺激性 Draize 实验多选用兔作为实验动物，但兔眼与人眼结构有差异，结果受主观判定影响大，给动物带来痛苦，其替代方法主要是离体器官实验，如牛角膜混浊和渗透性实验、离体鸡眼实验，ECVAM 与 ICCVAM 均于 2007 年通过对该两种方法的验证和认可，但这两种方法也无法替代 Draize 实验。

大、小鼠致畸实验是目前发育毒性测试中使用最多的方法，替代方法中仅胚胎毒性的胚胎肝细胞实验（Embryonic stem cell test，EST）纳入 OECD 草案 43，EST 具有高通量检测和评价的特点。但是，由于生殖过程的复杂性，各种替代方法均不能单独作为评价方法对外源性化学物质进行安全性评估，需强调的是由于现行的方法仍不能满足安全评价的需要，必须加强新方法的开发。

遗传毒性的评价程序必是一组体内实验与体外实验的组合，这种观点在国际上已被广泛认同，这是因为化学物质的致突变机制相当复杂，遗传毒性实验不仅是描述性毒理研究，同时也是机制性毒理研究，且作用的靶细胞可能是体细胞，也可能是生殖细胞。通常认为，体外实验可检测化学物质本身是否具有遗传毒性，体内实验则可观察化学物遗传毒性作用的内部相关因素。遗传毒性实验中替代体外染色体畸变检测的体外微核实验于 2009 年已被 OECD 接受并形成指南 487。

替代方法的应用领域虽相当广泛，但仍需谨慎扩大。对于关系到人类健康和生命安全的实验，如人类疾病模型的实验、关键的药效学实验和新药安全评价中中药的毒理学实验等，实验动物仍是最客观、科学、参考意义最大的观察对象。因此，我们谈替代方法不是绝对替代的概念，而是囊括替代、减少、优化和实验组合的多重概念。动物实验替代方法是在经典的动物实验基础上发展而来，但并不是每种动物实验都有相对应的替代方法。各个行业进行替代方法研究、推广的进展速度都不一样。从替代方法在国外的发展历史来看，欧盟的替代方法主要用于化妆品，因为化妆品人用量有限，其健康风险可以控制在有限范围。在药品、生物制品、化学品、农药等行业，替代方法的研究与推广步伐明显缓慢，原因之一是以上各种化学品与人体接触机会、频率都较化妆品多，且接触途径也更广泛、直接，随之带给人类的潜在风险也成倍增

加，因此在对这些类别的化学品进行毒性评价时，仍倾向于采用与人体更为相似的整体实验动物进行研究，或者将动物实验作为最后的实验手段，以期待能得到每种化合物最为科学、客观的数据。

（常秀丽）

第五章 外源化学物的致癌作用

肿瘤(neoplasm, tumor)是机体在各种致瘤因素作用下,局部组织的细胞在基因水平上失掉了对其生长的正常调控,导致克隆性异常增生而形成的新生物。肿瘤是世界各国第一或第二位的死亡原因,全世界每年约有700万人死于肿瘤,已成为一类严重影响人类健康和生命的疾病。

化学致癌作用(chemical carcinogenesis)是指化学物质引起或诱导正常细胞发生恶性转化并发展成为肿瘤的过程,具有化学致癌作用的化学物质称为化学致癌物(chemical carcinogen)。

1775年英国的Pott发现扫烟囱工人易患阴囊癌,推测与煤烟灰过度暴露有关。1879年Haerting和Hesse描述了铀矿工人中肺癌的发生情况,这是将人体内脏肿瘤与环境致癌因素暴露相联系的首次报道。1895年德国的Rehn发现染料厂工人患职业性膀胱癌明显多于其他行业,怀疑是化学物引起的肿瘤;1915年日本学者山极胜三郎和市川厚一用煤焦油多次涂抹兔耳成功地诱发出皮肤癌,从此开始了实验性化学致癌的研究。1934年英国的Kennway从煤焦油中分离出多种多环芳烃化合物,有些对动物有致癌性。1938年,美国人Heupper使用苯胺染料生产工人接触的β-萘胺和联苯胺诱发犬膀胱癌获得成功。1945年,英国人Case对染料工业中的膀胱癌进行流行病学调查,证实β-萘胺具有致癌性。至此,化学物对动物和人致癌的概念得以确立。目前已有约1 700多种化学物经动物实验发现对动物有致癌性,确定对人类致癌性的有108种。一般认为,80%~90%人类癌症与环境因素有关,其中主要是化学因素。因此,研究化学致癌具有重要意义。

第一节 化学致癌物的分类

化学致癌物由于种类多、对致癌性的确认复杂等原因,为便于研究和管理,提出了不同的分类方法。

一、根据致癌物在体内发挥作用的方式分类

根据致癌物在体内发挥作用的方式可分为直接致癌物和间接致癌物。有些致癌物可以不经过代谢活化即具有活性,称为直接致癌物(direct acting carcinogen);而大多数致癌物必须

经代谢活化才具有致癌活性，称为间接致癌物(indirect acting carcinogen)，在其活化前称为前致癌物(procarcinogen)，经过代谢活化后的产物称为终致癌物(ultimate carcinogen)，在活化过程中接近终致癌物的中间产物称为近(似)致癌物(proximate carcinogen)。

二、根据致癌物的作用机制分类

根据化学致癌物的作用机制，化学致癌物可分为遗传毒性致癌物、非遗传毒性致癌物。遗传毒性致癌物的特点为：遗传毒性实验显示具有致突变性；致癌性有剂量依赖性；理论上无阈值。非遗传毒性致癌物的特点为：遗传毒性实验显示无致突变性；致癌性有剂量依赖性；有阈值和可逆性；可作用于肿瘤促长阶段；不直接引起 DNA 损伤；有物种、品系、组织特异性。

1. *遗传毒性致癌物*　直接以 DNA 为作用靶，属于遗传毒性致癌物有以下 3 类。

(1) 直接致癌物：烷基和芳香基环氧化物、亚硝酰胺、亚硝基脲、内酯、硫酸酯等。

(2) 间接致癌物：多环芳烃类化合物、芳香胺类、亚硝胺类、硝基杂环类、偶氮化合物、黄曲霉毒素 B1 等。

(3) 无机致癌物：钴、镭、氡可能由于其放射性而致癌；镍、铬、铅、铍及其某些盐类均可在一定条件下致癌。

2. *非遗传毒性致癌物*　不是直接以 DNA 为作用靶，但可能间接地影响 DNA 并改变基因组导致细胞癌变，或通过促长作用、或通过增强作用导致癌的发展。主要有以下 6 类。

(1) 促长剂：促长剂本身不能诱发肿瘤，但能导致引发细胞发生克隆扩增。已知的促长剂有苯巴比妥、灭蚁灵、DDT、氯丹、丁基羟甲苯、四氯二苯并对二噁英(TCDD)、雌激素、胆酸、巴豆油中提取的 12-邻十四烷酰大戟二萜醇-13-乙酸酯(TPA)等。

(2) 激素：激素稳态机制紊乱打破了内分泌系统平衡，可引起细胞分化异常，起促长剂作用。已知雌二醇和己烯雌酚可诱发动物和人肿瘤；己烯雌酚还具有经胎盘的致癌作用。抑制甲状腺激素合成或分泌的物质可使体内促甲状腺素水平升高并导致宿主甲状腺瘤，如长期大剂量使用抗甲状腺物质(如硫脲、某些磺胺类药物)可诱发肿瘤。

(3) 细胞毒性剂：可通过引起细胞死亡，导致细胞代偿性增殖活跃而诱发肿瘤。如氮川三乙酸(nitrilotriacetic acid, NTA)可引发大鼠和小鼠肾癌及膀胱癌，初步发现其作用机制是将血液中的锌带入肾小管超滤液，并被肾小管上皮重吸收。由于锌对这些细胞具有毒性，可造成损伤并导致细胞死亡，从而引起增生和肾肿瘤形成。在尿液中 NTA 还与钙络合，使钙由肾盂和膀胱的移行上皮渗出，以致刺激细胞增殖，并形成肿瘤。

(4) 过氧化物酶体增生剂：具有使啮齿动物肝脏中的过氧化物酶体增生的各种物质都可诱发肝肿瘤，如降血脂药物氯贝丁酯(安妥明)，增塑剂二(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯、二(2-乙基己基)己二酯，某些卤代烃化合物如三氯乙烯、全氟乙烯及分支链烷烃 2，2，4-甲基戊烷等。目前认为，肝过氧化物酶体及 H_2O_2 增多，可导致活性氧增多，造成 DNA 损伤并启动致癌过程。

(5) 免疫抑制剂：免疫抑制过程从多方面影响肿瘤形成，如咪唑硫嘌呤、巯嘌呤和环孢素 A 可诱发人或动物的白血病或淋巴瘤等。

(6) 固态物质：各种化学物质的薄片可导致肿瘤形成，其化学成分并不重要，关键是大小和形状，而且光滑者比粗糙者更有效，有孔的比无孔的效果差。其作用机制可能是固态物质可对上皮成纤维细胞增殖提供基底。另外，石棉和其他矿物粉尘，如铀矿或赤铁矿粉尘，可增强

吸烟致肺癌的作用。

还有一些化学物致癌方式尚未完全阐明，如四氯化碳、氯仿、某些多氯烷烃和烯烃等。这些物质在致突变试验中为阴性或可疑，体内和体外研究也未显示出能转化为活性亲电子性代谢产物。硫脲、硫乙酰胺、硫脲嘧啶和相似的硫酰胺类都有致癌性，其靶器官是甲状腺，有时也可能是肝脏。抗组织胺药噻吡二胺(methapyrine)能诱发大鼠肝癌。

此外，还有一类助癌物(cocareinogen)，本身没有致癌性，但在接触致癌物之前或与致癌物同时接触，助癌物可增加肿瘤发生。例如，芘在苯并(a)芘致皮肤肿瘤中起助癌作用，纸烟烟雾中的儿茶酚等酚类兼具助癌物和促长剂的作用。助癌作用的机制可涉及增强致癌物的吸收、增强间接致癌物的代谢活化或抑制致癌物的代谢解毒、耗竭内源性结合底物(如谷胱甘肽等)、抑制 DNA 修复以及促进细胞增殖等。

近年，根据对致癌机制的认识也有将致癌物分为：①DNA 反应性致癌物(DNA-reactive carcinogen)，包括依赖活化和不依赖活化的致癌物；②表遗传致癌物(epigenetic carcinogen)，指不依赖化学反应性，不形成 DNA 加合物，而产生致癌性组织的靶细胞或间接导致肿瘤转化或增强从原因不明性转化细胞发展为肿瘤，包括促癌剂、内分泌调节剂、免疫抑制剂、细胞毒素和过氧化物酶体增殖剂等；③矿物和金属。

三、根据对人和动物的致癌性分类

WHO 国际癌症研究所(IARC)根据对人类和对实验动物致癌性资料，以及在实验系统和人类其他有关的资料(包括癌前病变、肿瘤病理、遗传毒性、结构-活性关系，代谢和动力学，理化参数及同类的生物因子)进行综合评价，将环境因子和类别、混合物及暴露环境与人类癌症的关系分为下列 4 类：

1 类：对人类是致癌物，对人类致癌性证据充分。目前确定的有 108 种。

2 类：对人类很可能或可能是致癌物，又分为 2A 和 2B 两类。

2A 类：对人类很可能(probably)是致癌物，指对人类致癌性证据有限，对实验动物致癌性证据充分。目前评价的有 59 种。

2B 类：对人类可能(possible)是致癌物，指对人类致癌性证据有限，对实验动物致癌性证据并不充分；或对人类致癌性证据不足，对实验动物致癌性证据充分。目前评价的有 267 种。

3 类：现有的证据不能对人类致癌性进行分类。目前有 508 种。

4 类：对人类可能是非致癌物。目前评价的有 1 种。

还有一些机构或国家针对人和动物的致癌性提出了不同的分类方法。联合国全球化学品统一分类和标签制度(GHS)和美国 NTP 将致癌物分为两类：第 1 类为已知或假定的人类致癌物，第 2 类为可疑的人类致癌物。美国政府工业卫生学者协会(ACGIH)将致癌物分为确认的人类致癌物、可疑的人类致癌物、确认的动物致癌物、与人类关系不详的致癌物、未分类的人类致癌物、未疑为人类致癌物 5 类。欧盟将致癌物分为已知人类致癌物、应视为人类致癌物和引起关注的物质 3 类。

此外，还有根据人工合成还是自然产生分为人工合成致癌物和天然致癌物；根据致癌物作用的靶器官分为肝脏致癌物、肾脏致癌物等；根据化学物的结构或类型分为烷化剂、多环芳烃类、芳香胺类、氨基偶氮染料、亚硝胺类化合物、植物毒素和金属类致癌物等分类方法。

第二节　化学致癌机制

一、代谢活化

致癌物通过不同途径进入人体后，有些可直接与靶分子起作用，有些需经过代谢，所产生的代谢产物才有致癌活性(代谢活化)。各种有活性的致癌物再经历不同的代谢过程成为致癌性减弱、极性增高的产物排出体外(代谢灭活)。不同致癌物代谢活化与代谢灭活的过程不一，但都受一系列Ⅰ、Ⅱ相酶所催化。

一般将未经代谢活化、不活泼的间接致癌物称为前致癌物；经过体内代谢转变为化学性质活泼、寿命极短的致癌物称为近致癌物。近致癌物进一步转变为带正电荷的亲电子剂(electrophlic reagent)，称为终致癌物。终致癌物与DNA、RNA、蛋白质等大生物大分子共价结合而导致它们的损伤，从而引起细胞癌变。其中，DNA是终致癌物攻击的主要目标，终致癌物与DNA结合导致DNA的化学修饰，形成致癌物-DNA加合物。在间接致癌物的代谢过程中涉及一系列的酶类，其中最重要的活化酶是混合功能氧化酶系统，包括细胞色素P450和P448。如苯并(a)芘(benzo[a]pyrene, BaP)本身无致癌活性，必须在体内经混合功能氧化酶(细胞色素P450单加氧酶如CYP1A1、CYP1A2)代谢活化后才呈现致癌作用。其代谢活化过程一般为：①被CYP45O氧化在7，8碳位上形成环氧化物，即7，8-环氧苯并(a)芘；②7，8-环氧苯并(a)芘经环氧化物水解酶作用生成7，8-二氢二醇苯并(a)芘；③经CYP1A1进一步氧化成二氢二醇环氧苯并芘[benzo(a)pyrene-trans-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide, BPDE]、反式二氢二醇环氧苯并芘(anti-benzo[a]pyrene trans-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide, anti-BPDE)，BPDE和anti-BPDE为终致癌物。几种经典致癌物的代谢见表5-1。

表5-1　几种经典致癌物的代谢

致癌物	代谢反应	代谢产物
黄曲霉毒素 B_1	脱甲基 羟化 环氧化反应	羟化代谢产物：与谷胱甘肽、葡萄糖醛酸、硫酸结合，由尿和胆汁排出 环氧化反应产物：终致癌物黄曲霉毒素 B_1，2，3-环氧化物，可与DNA脱氧鸟嘌呤第7位N结合形成加合物
苯并(a)芘	羟化 环氧化反应	羟化代谢：产物与谷胱甘肽结合排出 环氧化反应：主要终致癌物7，8-二羟9,10-环氧苯并(a)芘可与DNA结合
二甲基亚硝胺	脱甲基 脱亚硝基反应	脱亚硝基代谢：P450催化下生成醛和胺 脱甲基代谢：终致癌物甲基碳鎓离子，可使核酸和蛋白质的亲核部位甲基化

化学致癌物的一般代谢特点：①以氧化过程为主，形成的终致癌物具有亲电子性(图5-1)能与DNA结合；②可在多种组织、器官中进行，具有组织器官特异性，主要以肝脏为主；③人和动物对化学致癌物的代谢在种属、品系、家族和个体上的差异与遗传因素决定的代谢酶系的多态性有关，致癌物代谢酶的活性因人而异，个体间可相差30～100倍，个别的甚至可以达到1 000倍。

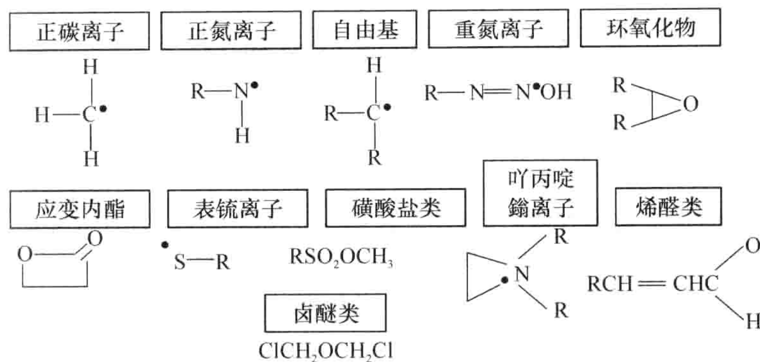


图 5-1 常见的亲电子剂

二、化学致癌机制

近50多年来癌变的体细胞突变理论占主导地位，认为肿瘤是从单个体细胞、经突变积累的多阶段过程而形成；每一个癌细胞均有形成新肿瘤的能力。实验证明，多数肿瘤是单细胞克隆起源，如许多肿瘤细胞群都具有相同的染色体畸变和同工酶，就是肿瘤发生的单克隆学说的证据。但是，近年来该理论暴露的问题越来越多，且在其指导下肿瘤临床治疗未能取得重大突破，随着不符合体细胞突变理论事实的增加，近年来一些学者提出了不同的癌变机制。

（一）多阶段致癌过程

目前较公认的学说是化学致癌作用至少包括3个阶段：引发（或启动）阶段（initiation）、促长阶段（promotion）和进展阶段（progression）。该学说已在动物实验模型中得到证实，而在人体中也得到间接证据。

1. 引发阶段　该阶段是一相对迅速的过程，是指化学致癌物或其活性代谢物与DNA作用，导致体细胞突变成引发细胞的阶段。在引发过程中至少有3个细胞功能是重要的，即致癌物的代谢、DNA修复和细胞增殖。通常化学致癌物对靶细胞DNA产生损伤作用，如果细胞中原有修复机制对DNA损伤不能修复或修而不复，那么，这些DNA损伤经细胞分裂增殖固定下来，造成单个或少量细胞发生永久性不可逆转的遗传性改变，成为引发细胞。在此阶段，可使原癌基因活化或抑癌基因失活，使细胞发展成为具有肿瘤潜能的引发细胞。具有引发作用的因素，称为引发剂，引发剂没有阈值。

2. 促长阶段　此阶段是引发细胞增殖成为癌前病变或良性肿瘤的过程。由于引发细胞改变了遗传信息的表达，加上各种因素的作用，引发细胞以相对于周围正常细胞的选择优势进行克隆扩增，形成显微镜下或肉眼可见的细胞群，即良性肿瘤（如乳头状瘤或腺瘤）。促长剂可致引发细胞的增殖，导致良性局灶性病理损害，因此，促长阶段癌细胞的表型发生变化，恶性肿瘤细胞的各种性状得以表达。

促癌剂的作用机制主要有以下3个方面：①通过细胞毒性或激素作用刺激细胞增殖。如高脂肪饮食可使乳腺癌的发病率增高，原因是高脂肪饮食可使催乳素分泌增多，而催乳素对乳腺癌的发生有促进作用。②抑制细胞间的信息互通，从而解除细胞生长的接触抑制，启动了的细胞能逃脱周围正常细胞的抑制，出现增殖失控。③免疫抑制。免疫受到抑制以后，机体的免疫机制便不能对肿瘤细胞进行免疫监视。

促长剂单独使用不具致癌性，存在阈剂量和最大效应。促长阶段历时较长，早期有可逆性，晚期为不可逆的，必须持续给以促长剂才能使肿瘤得以发展。具有促长作用的巴豆油中的有效成分佛波醇酯（TPA）为经典的促长剂。

3. 进展阶段　该阶段是从促长阶段产生的细胞群（癌前病变、良性肿瘤）转变成恶性肿瘤的过程。当细胞开始失去维持核型稳定的能力并出现染色体畸变时，它们即进入进展期。核型不稳定性进一步促进肿瘤细胞的生长和恶性表型的发展，同时引起细胞代谢调节功能的改变，且逃避机体免疫监视等功能。在此阶段，细胞表现出不可逆的遗传学改变，其标志为遗传不稳定性增加和恶性变化，在形态上或功能代谢和行为方面逐渐表现出恶性肿瘤的生物学特征，如生长速度、侵袭性、转移能力以及生理生化、免疫性能的改变等。

（二）基因与癌变

从本质上说，肿瘤是一种遗传物质改变导致的体细胞遗传病。大多数环境因素的致癌作用都是通过影响遗传基因起作用的，肿瘤是细胞中多种基因突变累积的结果。已知致癌作用的启动主要导致细胞基因组的突变或表遗传的改变，而其靶基因主要是癌基因和抑癌基因，以及细胞信号转导、细胞周期和凋亡调控基因。

1. 癌基因（oncogene，亦称为致癌基因）　这是一类会引起细胞癌变的基因，参与细胞从正常生长状态到肿瘤的过程。存在于正常细胞中未被激活的癌基因，称为原癌基因（protooncogene）。当原癌基因被激活后才能转变为癌基因。癌基因可分为两大类：一类称病毒癌基因，是反转录病毒中能够使细胞发生恶性转化的基因；另一类称细胞转化基因，它存在于细胞中，能使正常细胞转化为肿瘤细胞。细胞转化基因实质上就是由一类原癌基因突变而来的。按原癌基因产物的功能，可以把癌基因分为生长因子与生长因子受体类、蛋白激酶类、G蛋白功能类和核内蛋白类等4类。癌基因属于调控基因，其产物与细胞内的信号传递、蛋白质活化、酶的激活、转录的启动和调节、细胞分裂与分化过程等各个环节相关。

原癌基因的激活方式无非是基因本身或其调控区发生了变异。原癌基因激活后，导致基因的过度表达，或产物蛋白活性增强，使细胞过度增殖而形成肿瘤，如在肝癌中 *cyclin A* 过度表达，在乳腺癌中常有 *cyclin A*、*B*、*D1*、*E* 等过度表达。通常情况下，原癌基因的激活有以下几种方式。

（1）点突变：如 *Ras* 基因家族，均以点突变为主，如膀胱癌细胞中克隆出来的 *c - Ha - RAS* 基因与正常细胞的相比仅有一个核苷酸的差异。

（2）DNA 重排：原癌基因在正常情况下表达水平较低，但当发生染色体的易位或倒位时，处于活跃转录基因强启动子的下游而产生过度表达。如 Burkitt 淋巴瘤细胞的染色体易位，使 *C-MYC* 与免疫球蛋白 IG 重链基因的调控区为邻，由于 IG 的启动子为强启动子，且在 CH - VH 之间还有增强子区，因此，该基因表达十分活跃，可以使 *C-MYC* 过度表达；另外，在良性甲状旁腺肿瘤患者的染色体中，*CYCLIN D1* 基因倒位处于甲状旁腺素基因启动子的下游而过度表达，使细胞出现异常增殖。染色体易位的主要原因是人类染色体存在着脆性位点，而染色体重排的断裂热点多位于脆性位点。恶性肿瘤的染色体重排是获得性的体细胞的变化，而非发生在生殖细胞里面的变化。

（3）插入激活：某些不含 v-onc 的弱转化反转录病毒，其前病毒 DNA 可以插入宿主 DNA 中，引起插入突变。比如，反转录病毒 MoSV 感染鼠类成纤维细胞后，病毒两端各有一个相同的冗长末端重复序列（LTR），该重复序列不能编码蛋白质，但是含有启动子、增强子等调控成分；当病毒基因组的 LTR 整合到细胞癌基因 *c-Mos* 邻近位置时，*c-Mos* 处于 LTR 的强启动子

和增强子作用之下而被激活，导致成纤维细胞转化为肉瘤细胞。再如，鸟类白血病病毒 ALV 不含 v-onc，但可以插入 *c-myc* 的上游，导致该基因的过度表达。

(4) 基因扩增：在某些造血系统恶性肿瘤中，癌基因扩增是一个极常见的特征，如前髓细胞性白血病细胞系和这类病人的白血病细胞中，*C-MYC* 扩增 8～32 倍。癌基因扩增往往导致染色体结构异常，常出现双微体(double minute chromosomes, DMs)、均染区(homogenously stained region, HSR)、姊妹染色单体非均等交换(unequal sister chromatid exchange, USCE)等。其中 DMs 和 HSR 是最常见的类型，在具有 DMs 或 HSR 的直肠癌患者中 *C-MYC* mRNA 含量是正常人的 30 倍。

2. *抑癌基因* 也称为抗癌基因，是一类抑制细胞过度生长、增殖从而遏制肿瘤形成的基因。抑癌基因的产物是抑制细胞增殖，促进细胞分化和抑制细胞迁移，因此起负调控作用。对于正常细胞，调控生长的基因(如原癌基因等)和调控抑制生长的基因(如抑癌基因等)的协调表达是调控细胞生长的重要分子机制之一。两类基因相互制约，维持正负调节信号的相对稳定，当细胞生长到一定程度时，会自动产生反馈抑制，这时抑制性基因高表达，调控生长的基因则不表达或低表达。

通常认为抑癌基因的突变是隐性的。抑癌基因的产物主要包括：①转录调节因子，如 RB、P53；②负调控转录因子，如 WT；③周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKI)，如 P15、P16、P21；④信号通路的抑制因子，如 RAS GTP 酶活化蛋白(NF-1)、磷脂酶(PTEN)；⑤DNA 修复因子，如 BRCA1、BRCA2。⑥与发育和干细胞增殖相关的信号途径组分，如 APC、AXIN 等。

抑癌基因失活的途径有：①等位基因隐性作用，失活的抑癌基因中的等位基因在细胞中起隐性作用，即一个拷贝失活，另一个拷贝仍以野生型存在，细胞呈正常表型，只有当另一个拷贝失活后才导致肿瘤发生，如 *RB* 基因。②抑癌基因的显性负作用(dominant negative)：抑癌基因突变的拷贝在另一野生型拷贝存在并表达的情况下，仍可使细胞出现恶性表型和癌变，并使野生型拷贝功能失活。如近年来证实突变型 P53 和 APC 蛋白分别能与野生型蛋白质结合而使其失活，进而转化细胞。③单倍体不足假说(haplo-insufficiency)：某些抗癌基因的表达水平十分重要，如果一个拷贝失活，另一个拷贝就可能不足以维持正常的细胞功能，从而导致肿瘤发生。如 *DCC* 基因一个拷贝缺失就可能使细胞粘膜附功能明显降低，进而丧失细胞接触抑制，使细胞克隆扩展或呈恶性表型。

(三) 细胞增殖、死亡与致癌

在恶性肿瘤和癌前病变中通常存在细胞增殖(CP)与凋亡的动态平衡失调。细胞增殖可通过多种途径影响从启动、促癌、进展以及转移各个过程。引发过程中，被致癌物损伤的 DNA 分子在修复前进行了复制，这种复制使 DNA 分子的损伤得以被固定，从而在新合成的 DNA 中增加了核苷酸序列改变的机会。在此基础上，经过细胞分裂才可能出现各种形式的基因突变、染色体畸变，可见细胞增殖是一个影响致癌过程的重要因素。若细胞暂时停止进入细胞分裂周期，细胞 DNA 就会有较充分的时间进行修复，突变就可能不出现。即使有引发细胞出现，没有 CP，启动细胞的数目亦不会增加。受损细胞的数目愈多，得到下次遗传性损害的机会亦愈大，发展成可见肿瘤的机会亦愈大。

促癌和进展阶段中 CP 的作用更为明显，其机制也更为复杂，大致和以下几种机制有关：端粒调控与细胞永生化、生长因子及其受体的异常表达、细胞周期的异常分子调控，以及癌基因激活和抑癌基因失活。

永生化(immortalization)指体外培养细胞自发或受外界因素的影响从增殖衰老危机中逃离,从而具有无限增殖能力的过程。端粒(telomere)是真核细胞线形染色体末端的一种特殊结构,由端粒 DNA 和端粒蛋白质构成,端粒 DNA 是富含 G 的高度保守的重复核苷酸序列。端粒酶是一种能够催化延长端粒末端的核糖核蛋白(RNP),由 RNA 和相关蛋白质组成,含有引物特异识别位点,它能够以自身携带的 RNA 为模板,反转录合成端粒 DNA 并添加于染色体末端,从而维持了端粒长度的稳定。Harley 等提出的"端粒假说"认为,在细胞分裂的过程中,端粒序列会不断丢失,导致端粒长度缩短;当细胞分裂一定次数后,端粒缩短到一定长度,细胞进入第一死亡期(M1)。如果某些抑癌基因(如 *P53*、*Rb*)发生突变,或细胞被某些病毒转化(如 SV40T 抗原),细胞便越过 M1 期继续分裂,端粒便继续缩短,最终达到第二死亡期(M2),此时大部分细胞由于寿命达到极限而死亡,但有少数细胞在此阶段激活了端粒酶,端粒功能得以恢复,从而逃避 M2 危机,获得永生化。发生永生化的细胞往往是致病细胞,即癌细胞。

生长因子是一类对细胞生长有高效调节作用的多肽物质,是导致细胞生长的信息分子,一般通过与细胞膜上特异受体结合而产生效应。生长因子还具有调节细胞分化及一些与细胞生长无关的功能。一种生长因子受体可以与不同生长因子结合,一个细胞上亦有多种生长因子受体存在。生长因子通过多种途径把细胞生长增殖信息传到核内,使相关基因转录加强,从而产生细胞生长增殖效应。因此,生长因子直接或间接参与了细胞生长的生理、病理过程,在组织再生、创伤愈合、炎症反应、肿瘤等过程中起着重要作用。许多生长因子和生长因子受体往往是原癌基因编码的产物,它们促进机体不同发育阶段的细胞生长增殖,但当原癌基因发生突变或激活,生成或过量表达癌基因产物,将导致细胞生长增殖失控,引起肿瘤。

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,指从细胞分裂结束开始到下一次细胞分裂结束为止的过程。细胞在细胞周期中依次经过 G1 期、S 期(DNA 合成期)、G2 期、M 期(有丝分裂期),完成其增殖过程。已发现的与细胞周期调控有关的分子很多,包括细胞周期蛋白(CYCLIN)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CDK inhibitor, CKI)。细胞周期调控是一个极其复杂的过程:一方面细胞正常分裂生长需要 CYCLIN 的合成与累积,需要 CDK 的催化作用;另一方面又需要 P53、P16 等参与细胞周期的监控。细胞周期的调控紊乱是许多肿瘤发生的机制之一。*CYCLIN* 和 *CDK* 是原癌基因,其表达失调可能导致癌变,*CKI* 则是肿瘤抑制基因,其功能失活也会导致细胞的无限制生长,成为肿瘤形成的原因。

大量无控制的细胞增殖固然是致癌过程不可缺少的条件,而细胞死亡调控的失调亦是导致肿瘤形成的一个重要(甚至可以说是必要)的条件。细胞凋亡广泛存在于正常组织的不同形态发生、生长与发育阶段,它在肿瘤的发生过程中也有重要作用,如果凋亡相关基因表达活跃,可以使细胞的凋亡增加;通过细胞凋亡,机体及时清除体内过多、受损的细胞如癌前细胞和癌细胞。如果凋亡受到抑制,则可能导致细胞的异常增生,从而引发肿瘤的形成。

(四) 非遗传机制与致癌

传统上将致癌过程中致癌因素对于 DNA 所引起的一系列启动作用列为遗传机制,而对于 DNA 以外的靶所起的作用称为非遗传或非遗传毒性机制。这类机制涉及的因素很多,如表遗传变异、免疫监视和免疫编辑、内分泌失衡等。

近年来,表遗传学(epigenetics)研究取得了突破性进展,发现 CpG 岛甲基化和组蛋白修饰对基因的表达起重要调节作用,这种基因的非序列性变化具有可遗传性,是表型遗传的物质基

础。表遗传在胚胎发育、基因印迹(imprinting)、X染色体失活、病毒等寄生性核酸序列灭活等方面发挥着重要功能;但如果这种修饰出现异常,则可能导致肿瘤等疾病的发生。肿瘤相关基因的表遗传变异是癌变的重要机制之一,与基因序列变异会导致原癌基因活化和抑癌基因失活一样,CpG岛的异常甲基化会导致众多抑癌基因、DNA修复基因和转移抑制基因的失活,而CpG岛的低甲基化则会导致原癌基因的活化。在肿瘤组织中能够检测到各种各样的肿瘤相关基因CpG岛异常甲基化,如细胞凋亡相关基因Dap激酶、*CASP8*等,细胞周期调控基因*RB*、*CDKN2B*、*P27/KIP1*等,以及细胞分化相关基因、DNA修复基因、转移相关基因、信号转导基因、转录因子等。这种异常甲基化可能发生在癌变的各个阶段,从而影响肿瘤的发生和发展。

1970年Burnet提出了“肿瘤免疫监视”(cancer immunosurveillance)这一理论假说,该理论的核心是“机体胸腺来源的哨兵细胞会持续不断地监视新生的转化细胞”,即:正常细胞癌变的过程在基因组发生变化的同时,还会发生一系列表型的改变,如表达一些正常细胞没有的肿瘤抗原,癌细胞的肿瘤抗原可以被免疫系统识别,启动免疫应答机制将其清除掉。后来的研究发现,该理论有较大的局限性,按照此理论,肿瘤可以很好地被机体的免疫功能控制,而事实则是肿瘤不断地出现。2002年,Schreiber等在肿瘤免疫监视理论的基础上提出了肿瘤的“免疫编辑(cancer immunoediting)”学说,也即“3E学说”。该学说认为,在肿瘤发生初期,肿瘤细胞被免疫系统清除(elimination);之后出现肿瘤生长与免疫清除的平衡(equilibrium);而在后期,肿瘤细胞则逃逸(escape)出免疫监视机制,最终发展成为临床可见的肿瘤块。

内分泌激素致癌的研究成果主要来自动物实验;在人类,因所需剂量大、潜伏期长,且人类的遗传体质和环境因素特别复杂,累积的资料主要来自流行病学调查和临床观察。女性乳腺癌更年期前发病者被认为与雌激素刺激有关,在欧美乳腺癌远较我国和日本为多见。有人认为与雌激素中不同成分的比例有关,雌酮(E_1)和雌二醇(E_2)有促癌作用,而雌三醇(E_3)能起竞争抑制作用,与E_1及E_2相互对抗。激素在人类癌症的发病中不占主要地位,但不能忽视其在某些激素感应组织肿瘤的病因中有一定的作用。动物实验的资料虽不能生搬硬套到人类的肿瘤,但其阳性实验结果仍然值得借鉴。激素的促癌作用主要限于能促进靶细胞生长的激素,如雌激素、FSH、雄激素、促甲状腺激素等,激素的促癌作用还与其化学结构有关。

内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)可能是通过改变激素依赖细胞的DNA一级结构和功能,表现出遗传不稳定性,如出现染色体断裂、DNA加合物、原癌基因突变以及抑癌基因表达受阻等发生。流行病学研究表明,生产多氯联苯类(PCBs)的工人,其肿瘤患病率和死亡率显著高于常人;PCBs和DDT与乳腺癌的关系已在许多研究中得到证实;二噁英是PCBs的一类,其中的2,3,7,8-TCDD对动物有极强的致癌性。

另外,研究得比较多的还有细胞间隙连接通讯、信号转导系统,其中特别是蛋白激酶C作用、激素作用等方面的因素,它们在不同方面不同程度上参与了多阶段的致癌过程。对于某些致癌因素来说,这些非遗传机制对于它们所诱导的致癌过程起着关键的作用,是不容忽视的方面。

(五) 癌干细胞理论

癌症干细胞(cancer stem cell, CSC),又称癌干细胞、肿瘤干细胞,是指具有干细胞性质的癌细胞,也就是具有“自我复制”(self-renewal)以及“具有多细胞分化”等能力。通常这类的细胞被认为有形成肿瘤,发展成癌症的潜力,特别是随着癌症转移出去后,产生新型癌症的来源。

癌干细胞理论主要有以下两个重要内容:①癌干细胞起源于类似组织干细胞的、具有自

我更新能力的一小群细胞，它们通过遗传和表遗传的改变而获得了致癌性；也可能是增殖祖细胞(progenitor)通过遗传和表遗传的改变获得了自我更新和致癌性而成为癌干细胞。以上两种机制都可能起作用，因器官的位置不同而机制不同。癌变过程早期，因自我更新调节过程的失控而导致干细胞的扩增，是其关键事件。②只有很少量的癌干细胞才具有自我更新能力、参与肿瘤维持和转移，而其余的大部分癌细胞不具有这一能力。与组织干细胞一样，癌干细胞除可通过对称分裂和不对称分裂来扩增和维持癌干细胞库、产生不同分化程度的癌细胞外；还可通过对称分裂产生2个祖细胞，这些祖细胞的产生可致癌干细胞的耗尽，因此，促进这类分裂有望成为新的肿瘤治疗策略。干细胞的致癌模型见图5-2。

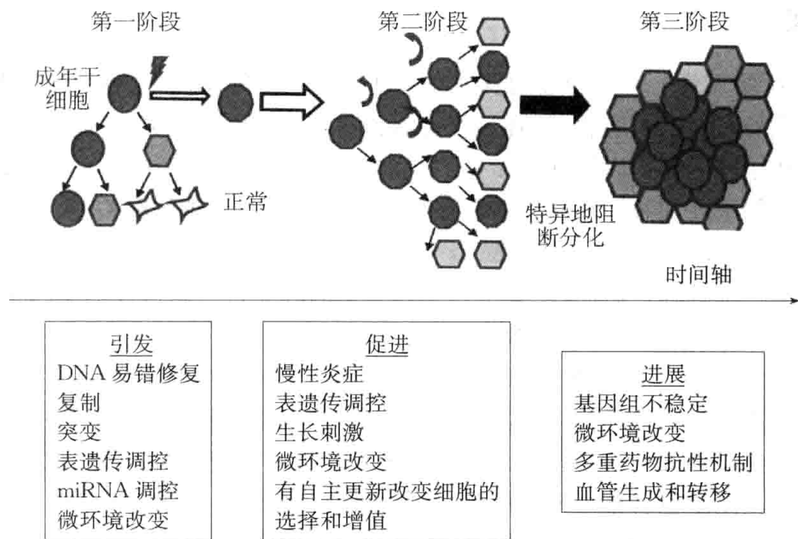


图5-2　基于干细胞的致癌模型

第三节　化学致癌的影响因素

一、营养因素

1. 蛋白质　流行病学研究发现，习惯于高碳水化合物伴低蛋白饮食人群，胃癌的发病危险增加。但在动物实验中，发现蛋白质摄入量低有抑癌作用，蛋白质高则对某些部位癌有促进作用，完全缺乏蛋白质可减少某些致癌物诱发特异器官肿瘤的可能性。需指出的是，大多数实验动物的生长速度远比人类快，对减少摄入量的反应也远比人类显著。因此，在解释动物实验中有关蛋白质与肿瘤或蛋白质对致癌物作用的影响时需慎重。

2. 脂肪　动物实验证实，食物脂类可影响肿瘤生成力，特别在乳腺和结肠。其机制可能为：微粒体单氧酶可能受动物食物中脂肪的种类和量的影响；食物脂肪可影响肠道内菌群，使胆汁酸和中性类固醇发生代谢变化，并将其转化成可能冲击癌生成过程的化合物；食物脂肪可能转化成反应性和诱变性过氧化物；食物脂肪可能改变正常激素平衡的稳定性。人的流行病学研究证实，食物脂肪与癌发生率相关联，尤其在乳腺。

3. 碳水化合物　人类结肠癌的发生与低渣易消化食物有关。动物实验证实高溶解度的

碳水化合物可增加饲料中致癌物的吸收；麦麸、米糠和果胶能降低某些大肠致癌物的致癌性。

4. *矿物质与维生素* 许多矿物质与维生素是体内一些酶的辅酶或辅因子，缺乏可对机体产生影响，使之对致癌物反应异常。如硒有抗氧化作用，有研究表明其能降低肿瘤发生率。核黄素对偶氮染料诱发大鼠肝癌有影响，还与口腔的肿瘤诱发过程有关。维生素C和E能防止亚硝胺和亚硝酰胺形成，可降低肝、呼吸道和上消化道的肿瘤形成。维生素A摄入不足使人类易患宫颈癌或膀胱癌，维生素E和其他合成抗氧化剂可减轻某些致癌物对一些靶器官诱发肿瘤。有研究表明，膳食中的叶酸、硒、茶多酚、砷等能引起表遗传改变，如动物和人体实验均表明，叶酸缺乏能够改变DNA的甲基化状态。

二、宿主因素

1. *性别和年龄因素* 不少肿瘤的发生在性别上存在差异，除乳腺癌和生殖器官肿瘤在女性明显多于男性外，甲状腺、胆囊、膀胱等器官的肿瘤也是女性多于男性；而鼻咽癌、食管癌、肺癌、胃癌、肝癌和结肠癌等则以男性为多见。性别上的这种差异，除一部分与雌激素有关外，还可能与性染色体的不同和某一性别较多地接受某种致癌因子的作用有关。

年龄在肿瘤的发病上也有一定的意义，一般来说，肿瘤的发生随年龄的增大而增加，这可用体细胞突变累积来解释。然而，多见于幼儿和儿童的肿瘤常与遗传性的基因损害有关，如视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤和肾母细胞瘤等。

2. *种族和地理因素* 某些肿瘤在不同种族或地区中的发生率有相当大的差别。在我国广东、四川、香港和新加坡等地的广东籍人中，鼻咽癌相当常见而且发病年龄较轻；欧美国家的乳腺癌年死亡率是日本的4～5倍，而日本的胃癌年死亡率比美国高7倍。以上说明肿瘤与种族有一定的关系。但是也有移民材料说明，移居美国的华侨和日侨中胃癌的发生率在第三代已有明显的下降，因此地理和生活习惯可能也起到一定的作用。

3. *内分泌因素* 内分泌紊乱与某些器官肿瘤的发生发展有密切的关系，如乳腺癌的发生发展可能与患者体内雌激素水平过高或雌激素受体的异常有关；乳腺癌在妊娠期和哺乳期发展得特别快，切除卵巢或用雌激素治疗可使肿瘤明显缩小。此外，激素与恶性肿瘤的转移及扩散也有一定的关系，如垂体前叶激素可促进肿瘤的生长和转移；肾上腺皮质激素对某些造血系统的恶性肿瘤有抑制其生长和转移的作用。

4. *免疫功能* 机体免疫功能对肿瘤的发生起着重要的作用。同样，在肿瘤转移的过程中，免疫状态的正常与否对转移发生的早晚及转移瘤生长的快慢发挥主导作用。免疫状态好者可抑制肿瘤转移，使肿瘤长时间的稳定而处于自限状态，而若机体免疫系统抗御肿瘤的能力降低时则可出现早期转移。

三、联合作用

除促癌剂可增强致癌作用外，在实际情况下，可同时或先后暴露两种或两种以上的致癌物，或致癌物和辅致癌物，或致癌物和抗致癌物等，因此可呈现多种联合作用的类型。

（一）协同致癌作用

协同致癌作用(syn-carcinogenesis)：两种物质致癌物同时作用或先后作用时则会显著增强诱发肿瘤的作用，如乙肝病毒和黄曲霉毒素都可分别诱发肝癌，同时接触则肝癌发生率相对增高。

(二) 辅致癌作用

辅致癌作用(co-carcinogenesis)或称助致癌作用:辅致癌剂(助致癌剂)在接触致癌物之前或同时接触的情况下增强整个致癌过程。有些化学物质既非引发剂,也非促长剂,本身并不致癌,但能增强引发剂和促长剂的作用,即能加速致癌作用的过程,此种物质称为辅致癌物。比较常见的辅致癌物有二氧化硫、乙醇、儿茶酚、芘和十二烷等;具有促长作用的巴豆醇二酯同时也是一种辅致癌物。辅致癌物与促长剂不同,促长剂只能促进已发生癌变细胞的增殖,对引发剂并无影响;而辅致癌物对与其同时接触机体引发剂和促长剂都具有增强促进作用。辅致癌剂的作用机制可能有:增强致癌物的吸收;增强遗传毒性致癌物的代谢活化或使其解毒减弱;抑制 DNA 修复;选择性增强 DNA 受损细胞的增殖等。

(三) 抗致癌作用

抗致癌作用(anticarconigenesis)或致癌抑制作用:非致癌物和致癌物共同存在时往往出现相互拮抗的现象,导致致癌作用减弱。这种作用多发生于非致癌物的化学结构与致癌物相似的情况下,特别是前者的剂量远较后者为高时尤易发生。例如,多环芳烃经部分羟化后失去致癌活性,再与原先完整的芳烃结构物质同时存在时,将抑制后者的致癌性。拮抗作用的机制可能是:在靶器官中发生竞争性的取代;活化作用酶系统活力发生改变;全身作用使解毒效果和受体比例发生改变。

第四节 外源化学物致癌性的测试和评价

一、外源化学物致癌性的测试方法

(一) 计算毒理学预测致癌性

计算毒理学(computational toxicology)是运用数学和计算机模型以帮助评价化学物对人和环境的危害性与危险度的一门毒理学分支学科。致癌物的种类繁多、化学结构复杂,因此可以运用计算毒理学的方法,从分析一种同系物着手,找出该系物质化学结构中与致癌性关系最密切的构分,以及其他构分改变时所产生的影响。如通过对数百种多环芳烃类化合物的小鼠皮肤癌诱发试验结果做的定量构效关系(QSAR)分析,表明不仅化学结构的微小变化都关系着致癌性的强弱,而且与其立体结构性的变化也有密切关系。迄今,有很多学者运用计算毒理学的方法对化学物的致癌性进行了预测,如:利用基于相对同义密码子使用度(relative synonymous codon usage, RSCU)方法,预测抑癌基因 *p53* 突变后的致癌性;运用对数拓扑指数预测多环芳烃的致癌性等。

另外,数据挖掘(data mining)方法是一个很有潜力的预测化学物致癌性的一个方法。可以结合因子分析、最大正交旋转法、改进的决策树、支持向量机和 TOPKAT 等方法,模拟、描述和预测分别来自不同数据库的结构多样的化合物的致癌性。

(二) 体外短期筛检试验

1. *以致突变实验作为致癌物筛检* 由于诱变性与致癌性有一定的相关性,因此可用这类实验进行致癌物质的筛选。但致突变实验仅能检测某种因素的致突变性,筛检实验为阳性的受试物,既可能是遗传毒性的致癌物,也可能是遗传毒性的非致癌物,也不能完全排除致癌性。

从已测试的有致癌潜力的化学物来看，其中60%的啮齿动物致癌物有遗传毒性，40%的啮齿动物致癌物无遗传毒性。从某些致突变实验对动物致癌物的检出率来看，Ames实验、小鼠淋巴瘤细胞突变实验和小鼠体内微核实验的敏感性/特异性分别为：58.8/73.9，73.1/39.0，78.7/30.8。而采用2种或3种遗传毒性组合实验，敏感性增加，而特异性减低。

目前常用的致突变实验还不能可靠地检测出以下遗传学终点：①能活化原癌基因的基因扩增；②线粒体DNA突变；③可使癌基因截短的重组；④非整倍性或重组所导致的隐性癌基因的纯合子或半合子。然而，这些单独或组合的改变很可能是致癌机制之一，因此有必要改进或建立新的致突变实验以适应对致癌物进行筛检的需要。

2. *细胞转化实验* 细胞转化是指外源因素对培养细胞所诱发的恶性表型改变。此种表型改变是因致癌物所致核型改变的结果，包括细胞形态、细胞生长能力、染色体畸变、生化表型，以及移植于动物体内形成肿瘤的能力等的变化。目前恶性转化实验可按所用的细胞分为3类：①原代或早代细胞转化实验：常用叙利亚仓鼠胚胎细胞（SHE细胞）、人类成纤维细胞、小鼠皮肤或大鼠支气管上皮细胞等。②细胞系转化实验：常用BALB/C-3T3、C3H10T1/2和BHK-21。③病毒感染细胞转化实验：常用RLV/RE细胞即劳舍尔氏白血病病毒感染的Fisher大鼠胚胎细胞和SAT/SHE细胞即猿猴腺病毒感染的SHE细胞。

进行恶性转化试验的目的在于：揭示体外培养细胞接触受试物后细胞生长自控能力丧失的某些机制。细胞生长自控能力表现为接触抑制，在液体培养基中的细胞贴壁后，正常克隆为单层且排列有序的细胞，而转化克隆往往为多层且排列紊乱。恶性转化细胞往往偏大且大小不等、核大而畸形、核浆比例倒置、核膜粗厚、核仁增生而肥大、染色质深染而粗糙。核仁和胞质均由于RNA增多而偏酸性，故呈嗜碱性染色而偏蓝，核分裂多见。

本实验的观察终点是细胞的恶性变，如将此种细胞移植于动物体内可形成肿瘤。因此，其可靠性超过致突变实验，但仍存在假阳性和假阴性问题。

（三）动物实验

1. *哺乳动物短期致癌实验* 又称有限动物实验（limited *in vivo* bioassay），指在有限的短时间内完成而不是终生，并且观察的靶器官限定为一个而不是全部器官和组织的哺乳动物致癌实验。目前较受重视的实验包括：①大鼠肝转变灶实验；②小鼠肺肿瘤诱发实验；③雌性SD大鼠乳腺癌诱发实验；④小鼠皮肤肿瘤诱发实验。由于肺和肝是最常见的发生肿瘤器官，也是许多致癌物的靶器官，因此①和②实验应用较广。至于小鼠皮肤肿瘤与SD大鼠乳腺癌两种实验，仅适用于部分类型的化学物质。进行这些实验时，除特定要求外，应遵从长期动物致癌实验的一般要求。上述任一实验的阳性结果，其意义与长期动物致癌实验相当。由于实验期短，又未检查其他器官和系统，特别是皮肤肿瘤和乳腺癌的诱发实验似乎仅适用于较小范围的化学物质类型，所以哺乳动物短期致癌实验阴性结果的意义较差。

2. *长期动物致癌实验* 又称哺乳动物终生实验，是目前公认的确证动物致癌物的经典方法。实验采用啮齿动物，通常是大鼠和小鼠。理想情况下该品系应具有低的自发致癌率，而又要对人致癌物敏感。通常用的大鼠是Sprague Dawley、Fisher F344和Wistar品系，小鼠用CD-1或C57BL品系。除相应对照组外，应设3个剂量组。应保证在实验结束时，每个剂量组和相应的对照组的动物数量至少有雌雄各50只。染毒方法取决于受试物的理化性质和人的主要接触方式。一般情况下，实验期限小鼠和仓鼠18个月，大鼠24个月。所有组织器官均进行大体和组织病理学检查。通过与对照组相比，实验组同类型肿瘤发生率是否增加；是否出现对照组中没有的肿瘤类型；实验组肿瘤发生是否早于对照组；与对照组比较，以实验组每个

动物的平均肿瘤数是否增加来判断受试物是否有致癌性。

3. *促癌剂的检测* 在哺乳动物长期致癌实验中，有时检出的是促癌剂，但在该实验中不能与其他类型的致癌物相区分。前述哺乳动物短期致癌实验的4种方法中，除大鼠乳腺癌诱发实验外，其余3种都适用于促癌剂的检测。具体方法是选用适当的启动剂，启动后1～2周开始用受试物染毒。对于启动剂，在小鼠皮肤肿瘤后诱发实验中可用多环芳烃类，在小鼠肺肿瘤诱发实验中可用氨基甲酸乙酯；在大鼠肝转变灶诱发实验中可用二甲苯并蒽，启动剂的剂量应较低，单独使用时不应引起或仅引起很少肿瘤形成。

由于不少促癌剂可能存在器官特异性，所以有时难于在3种试验中作出正确的选择。从这个角度看，体外实验也许更好，因为此时受试物直接与细胞接触，而不会表现出亲器官的特性。有两个实验稍加更改即可被应用，即恶性转化实验和哺乳动物细胞正向突变实验。

4. *转基因动物和新生鼠致癌实验* 目前被一些管理机构采用的转基因动物模型有：过量表达(原)癌基因的转基因动物，如①表达“*v-ras*”原癌基因突变的“TG. AC”小鼠；②在不同组织表达人“*c-Ha-ras*”原癌基因突变和扩增的“Tg-rasH2”小鼠。缺失某些基因的转基因动物(基因敲除动物)，如表达P53“肿瘤抑制基因”杂合性失活的“P53+/−”小鼠等。

TG. AC转基因小鼠致癌实验，采用8～9周龄小鼠，设3个剂量组和阴性、阳性对照组，每个组、每种性别15只；实验期限为26周。P53+/−基因敲除小鼠致癌实验，采用6～10周龄小鼠，设3个剂量组和阴性、阳性对照组，另外设两个野生型小鼠组，分别给予阴性对照物和高剂量的受试物；每个组、每种性别15只；实验期限为18～24周。

新生鼠致癌实验从20世纪50年代末开始研究，由于与成年鼠相比对致癌物的测试有较高的敏感性和特异性，尤其是对遗传毒性致癌物；肿瘤自发率低；可缩短实验周期、减少动物数，因而降低了成本。目前已被国际协调委员会(ICH)和美国、日本的管理机构采用。试验采用8～15天龄的CD-1小鼠，设3～4个剂量组和阴性、阳性对照组；每组、每种性别24只小鼠；实验期限为12个月。

（四）人群流行病学调查

要判别化学物是否为人类致癌物，人群流行病学资料具有决定意义，因为它是确定人类致癌物的唯一手段。通常的做法是，先进行动物致癌实验，根据阳性结果检出潜在的人类致癌物，或先进行描述流行病学调查或临床观察发现可疑人类致癌物，再进行队列研究或病例对照调查。肿瘤流行病学调查的结果为阳性时，如能重复，即另一同样调查也得出阳性结果并有剂量-反应关系，又可得到动物实验的验证，则意义较大。但一次调查结果如为阴性，也不能完全确定受试物为非致癌物，仅能认为未观察到致癌作用的接触条件(剂量和时间)的上限。因此，当接触年限较短或剂量较低时，流行病学调查的阴性结果不能否定对同一受试物进行另一调查的阳性结果。

二、外源化学物致癌性的评价方法

从20世纪80年代开始各国陆续制定了各类化学品致癌性评价指导原则或指南，规定了对各类化学品哺乳动物长期致癌实验测试要求和实验方法。如以药物为例，日本规定，如果临床预期连续用药6个月或更长时间，则需要进行致癌实验；尽管连续用药少于6个月，如果存在潜在致癌性因素，也可能需要进行致癌实验。美国规定，一般药物使用3个月或更长时间，需要进行致癌实验。欧洲规定长期应用的药物，即至少6个月的连续用药，或频繁的间歇性用

药以致总的暴露量与前者相似的药物需要进行致癌实验。我国规定，预期临床用药期至少连续6个月的药物一般应进行；连续用药没有6个月，但以间歇的方式重复使用，如治疗慢性和复发性疾病(包括过敏性鼻炎、抑郁症和焦虑症)，而需经常间歇使用的药物，一般也需进行；某些可能导致暴露时间延长的释药系统，也应考虑进行致癌实验。另外，在存在以下潜在致癌的担忧因素时也要考虑可能需要进行致癌实验：已有证据显示此类药物具有与人类相关的潜在致癌性；其构效关系提示致癌的风险；重复给药毒性实验中有癌前病变的证据；导致局部组织反应或其他病理生理变化的化合物或其代谢产物在组织内长期滞留。

对活性不明的化学物通常要求使用两种动物长期致癌试验进行评价，应优先选择大鼠和小鼠。ICH又进一步提出除两种啮齿动物长期致癌实验外，也可采用一种啮齿动物长期致癌实验(大鼠)加一项短期或中期啮齿动物致癌实验，短期动物实验为引发-促长作用的两阶段致癌实验，中期啮齿动物实验为转基因动物或新生鼠致癌实验。

由于通过动物致癌实验确定的致癌物，迄今只有极少量经肿瘤流行病学调查证实并在国际上得到公认为对人类致癌物。所以，评价致癌物时应分为人类致癌物和动物致癌物。

关于如何确定人类致癌物的问题，各国认识比较统一。主要根据为：①流行病学调查结果能够重复；②有剂量-反应关系；③有动物致癌实验阳性结果支持。

对于动物致癌物的确定，不同机构的制定标准尚不完全一致。国际肿瘤研究所(International Agency for Research on Cancer，IARC)提出的致癌性证据充分的条件，即确定了受试物与肿瘤发生率的增加有因果关系，同时：①见于两种或两种以上种系动物；②一种种属但经两次或多次独立的实验(包括不同时间或不同实验室或在不同实验方案条件下)；③一种种属一种实验，但恶性肿瘤发生率、出现肿瘤的部位、肿瘤类型或出现肿瘤的时间等方面极为明显突出。

第五节　外源化学物致癌的预防

一、避免接触致癌物

在工业生产中，工人长年累月地接触某些化学致癌物质后导致“职业性肿瘤”，如多环芳烃(polycyclic hydrocarbon)是最早被确认的化学致癌物，当年许多扫烟囱工人患阴囊癌就是这类致癌物长期刺激阴囊皮肤所致。又如长期接触石棉的工人可导致胸膜间皮瘤，染料生产工人由于接触芳香胺类化学物而致膀胱癌。电离辐射能增加肿瘤发病率，辐射所致的肿瘤有白血病、乳腺癌、甲状腺肿瘤、肺癌和皮肤癌等。由于“职业性肿瘤”病因比较明确，预防措施也就容易落实，如改变生产某些致癌物质的生产过程，采取防护措施以避免接触致癌物质，以及加强卫生监督等。

在生活环境中，焦油沥青中的二甲基苯蒽、苯并芘、二苯蒽等是分布最广的环境致癌物，常污染空气、水体和土壤。各种交通工具和工厂排出的废气中也含有很多重金属、有机致癌物，所以对工业生产中的废气、废水、废渣要进行科学管理、综合利用。

黄曲霉毒素在霉变花生中含量较高，致癌的靶器官主要是肝脏，导致肝细胞癌。根据我国江苏等地肝癌流行病学调查显示，黄曲霉毒素与当地肝癌的发生有密切关系。重要的预防措施是防止食物霉变、不吃霉变的粮豆类食品。另外，食品加工过程中要严防致癌性添加剂的加

入，如奶油黄就是一种化学致癌物。

由于人类皮肤长期暴露在日光和紫外线下可以诱发皮肤癌和黑色素瘤，因此，长期在室外的工作人员都应戴遮阳帽和穿长衣长裤，以避免过度的日光紫外线和热辐射。另外，我国西北地区的人有睡火炕的习惯，其背部皮肤长期受热辐射刺激可诱发背部皮肤癌。

二、保护高危人群

高危人群有：①职业易感人群；②家族有癌患者人群，其中有些肿瘤有家族聚集性和遗传易感性；③中老年人群，虽然癌症在各个年龄段都有发生，但肿瘤发病高峰还是在50岁以上中老年人群中，也就是说肿瘤发病风险会随年龄增加而增大；④个性易感人群，如精神长期处于抑郁、悲伤、自我克制及内向的人群易患癌症；⑤不良嗜好人群，如长期吸烟的人群易患肺癌、胃癌，喜饮过热的水、汤及吃刺激性强或粗糙食物的人群易患食管癌，喜抱怀炉或坐热炕的人易患皮肤癌，长期酗酒者易患食管癌、肝癌；⑥与癌有关疾病的人群，如长期患有慢性胃炎、宫颈炎、乙型肝炎、皮肤溃疡的患者易患癌症。以上人群应该针对他们各自的特点进行防护，同时采取普查、体检等措施，争取做到早期发现。

三、化学预防

癌症化学预防（chemorevention）这个名词在1976年由Michael Sporn创造，现在美国国立癌症研究所（NCI）以及其他多个机构和个人所公认的定义为利用天然、合成或生物物质来阻止、减缓或者逆转癌症发生发展过程，从而降低癌症发生率和死亡率的方法策略。

预防癌症最理想的方法是消除或避免致癌因子，如戒烟、防止紫外线照射等；但在许多情况下，致癌因素并不完全清楚或不能避免。因此，在致癌因素使正常细胞演变成癌的这一较长过程中，给予药物进行化学预防有一定的实际意义。

目前用于化学预防的药物主要是根据作用于致癌过程的时间不同来分类：①抑制致癌物形成的药物：如维生素C可抑制亚硝酸类化合物生成亚硝胺。②致癌阻断剂：如半胱氨酸抑制FAA致癌，谷胱甘肽灭活活化的致癌剂，黄酮类可通过诱导单功能氧化酶抑制致癌物DMBA，BP等。③致癌抑制剂：最常见的是维生素A类化合物，对已受到致癌物作用后的细胞仍有作用，有一定器官特异性；硒盐是另一类致癌抑制剂，可抑制病毒及多种化合物致癌；蛋白酶抑制剂和花生四烯酸的代谢物，也有抑制致癌作用。

（朱勇飞，张天宝）

第六章　遗传毒性

遗传(heredity)是亲代性状在子代重现的现象，广义的遗传可以包含细胞的分裂繁殖。DNA是遗传的物质基础，生物的一切遗传特性均由基因控制。

基因是DNA分子的一个片段，在染色体上占有一定位置，携带有遗传信息。基因信息的完整性、准确性及其表达量决定着后代的性状特征。基因分显性和隐性，隐性基因代表的性状只有在纯合子的情况下才能显现出来。遗传性状的相对稳定依赖于DNA的特殊结构、精确复制以及高保真修复能力。

生物物种代间及个体间的差异称变异(variation)。表观遗传学着重研究影响基因表达调控方面的因素，而遗传物质的改变称突变(mutation)，能引起突变的化学物质称诱变剂(mutagen)，引起生物体遗传物质突变的效应则称致突变作用(mutagenesis)。

自发突变的发生需要时间长、发生频率低，是物种进化的源泉；诱发突变发生的过程短、发生频率高，在一定条件下会对生物造成不可逆的危害。

遗传毒性(genetic toxicity)是毒理学的一个分支，研究外源化合物和辐射及其他环境因子对生物体遗传物质和遗传过程的有害作用，探讨遗传毒物与基因的交互作用及其诱发遗传毒性的机制，评定对人体和其他生物的影响与危险度，探索检测遗传毒性的早期生物标志物，建立遗传毒性预警体系，防止外源化合物对遗传物质的损伤、降低生物的遗传负荷，保护生态平衡和人体健康。

第一节　概　　述

一、遗传毒性的研究历史

de Vries在1904年指出X射线能改变生殖细胞的遗传物质。1927年，美国的H·J·马勒报告X射线是一种明确的诱变因子，提出了“突变率”的概念，并发明了用果蝇进行检测的方法。

20世纪40年代，科学家发现许多化学物质具有诱变性(如芥子气、氨基甲酸乙酯、环氧乙烷、乙烯亚胺、环氧丙烷、重氮甲烷、二乙基硫酸等)，Miller指出放射线诱发的体细胞突变可导致癌症和白血病。鉴于许多具有诱变性的化学物质被应用于医药、食品和化妆品领域的状况，

德国的植物学家 Alfred 在 1956 年提出不仅需要研究它们的疗效和一般毒性，还应该考虑其细胞遗传毒性。1968 年 J·E·克利弗发现着色性干皮病病人的皮肤很易发生光致癌化，并认为是由于缺乏 DNA 损伤修复功能所致，指出了环境因素、DNA 损伤修复与癌症之间的关系。1973 年 B·N·艾姆斯创立了一种简便快速地检测物质诱变毒性的方法，并且发现约 90%的致癌物具有诱变作用。研究致突变、致癌和致畸之间的关系以及根据诱变作用的检测结果预测致癌和致畸的可能性成为一段时期的热门课题。

二、遗传毒性的类型

遗传毒性通常指损伤 DNA 和改变 DNA 序列的能力，DNA 的损伤如果不能及时正确地修复，DNA 序列也会发生改变并导致突变，进而引起单个基因或基因组信息结构改变、基因功能丧失或改变。如果这些损伤是非致死的，将可导致遗传性改变。

关于遗传毒性的分类至今尚无一致意见。从遗传信息角度可分为基因突变、染色体结构改变和染色体数目改变 3 类；从机制角度可分为以 DNA 为靶的损伤和不以 DNA 为靶的损伤，前者包括基因突变(gene mutation)和染色体结构畸变(structural chromosome aberration)，后者主要指染色体数目畸变(numerical chromosome aberration)，包括整倍体(euploidy)和非整倍体(aneuploidy)改变；从遗传损伤能否为光学显微镜所见分为细胞水平损伤和分子水平损伤。

(一) 基因突变

基因是遗传信息的贮藏、传递与实现单位，信息内容包含在其核苷酸碱基的线性序列中，核苷酸的置换、增加或缺失都可导致 DNA 序列的改变。这种改变可发生于生殖细胞或体细胞，发生于生殖细胞的突变可以遗传给下一代，发生于体细胞的突变可以遗传给该细胞有丝分裂而产生的子代细胞。

1. 根据基因结构的改变分类

(1) 点突变(point mutation)：点突变可以是碱基的替代、插入或缺失，同时回复突变率很高。从嘌呤到嘌呤或从嘧啶到嘧啶的变化叫转换(transition)，而从嘌呤到嘧啶或从嘧啶到嘌呤的变化叫颠换(transversion)。

(2) 移码突变(frame shift mutation)：一个或两个碱基的插入或缺失都能引起移码突变；扁平碱基染料分子的嵌合也可引起移码突变。移码突变不但改变产物的氨基酸组成，也可使蛋白质合成过早终止。如果移码突变发生在关键部位，则常常导致发生此类突变的细胞或早期发育阶段的生物体死亡。

(3) 三核苷酸重复(triplet repeats)：特定的三联核苷酸被扩增、重复的数目超过正常。如 CCG 三联体核苷酸，在正常 *FMR-1* 基因中只重复 6～54 次，而在有脆性 X 综合征的人体中可扩展到 50～1 500 拷贝。突变的速率与拷贝数有关，重复序列的拷贝数越多，其子代发生进一步突变的危险越大。这种突变方式称为动态突变(dynamic mutation)。三核苷酸重复可发生在编码区或非编码区，可发生于减数分裂或有丝分裂。减数分裂的不稳定性表现为世代间拷贝数的改变，有丝分裂的不稳定性表现为同一个体不同组织或细胞系间拷贝数的不同。

(4) 大段损伤(large fragment damage)：DNA 序列上较长的一段序列发生重排分布，包括大段碱基的插入、缺失、取代、放大和倒位等。可将 10^4 个碱基对作为基因突变与染色体畸变之间的界限。DNA 重排以缺失多见，由于缺失的片段远小于光学显微镜所见的染色体缺失，故称小缺失，它往往是 DNA 链断裂重接的结果，在减数分裂过程中发生错误联会和不等交换

也可造成小缺失。

2. 根据对遗传信息的改变分类　从突变产生的效应看，碱基替代突变可进一步分为同义突变、错义突变、无义突变和终止密码子突变。同义突变没有引起基因产物氨基酸序列的改变，与密码子的兼并性有关。错义突变改变了产物的氨基酸序列，有些错义突变严重影响蛋白质的活性甚至导致活性完全丧失，影响表型，如果是必需基因常可致死。渗漏突变指错义突变产物具有部分活性，表型介于完全的突变型和野生型之间。中性突变指错义突变不影响或基本不影响蛋白质的活性，不表现明显的性状变化。中性突变与同义突变常统称为无声突变或沉默突变。无义突变指某个碱基的改变使某个代表氨基酸的密码子变为蛋白质合成的终止密码子，导致多肽链在成熟之前终止合成。移码突变、插入突变和缺失突变也能导致无义突变。如果终止密码子发生突变，成为某个氨基酸编码导致产生过长的肽链，称为终止密码子突变或延长突变。

3. 根据突变表型对外界环境的敏感性区分　广义上说，任何突变体都是条件型的，因为生物体任何基因的表达都依赖于各种体内和环境条件，如温度、必需营养素、抗生素等。例如，温敏突变体可通过改变温度来开关某一基因。对于非关键基因，既可以选择条件突变也可以选择非条件突变来研究；而对于关键基因则只能选择条件突变体来研究。条件突变体在特定条件下表现为突变的表型，被用来研究基因在细胞生存、生长、分化和个体发育中的作用。

4. 根据突变效应与野生型之间的关系区分　正向突变是指改变了野生型性状的突变，但突变体失去的野生型性状也可以通过第二次突变恢复，这第二次突变叫回复突变。真正恢复到野生型 DNA 序列的原位恢复突变很少，大多数都是在第二点发生了突变，而原来的突变基因座依然存在，只是它的表型效应被基因组上第二点的突变所抑制，又称为抑制突变。

5. 其他　基因突变通常发生在编码区也可发生在基因调控区。启动子区域的点突变可改变转录水平，如突变后可增强启动子对于转录的发动作用称启动子增效突变；而降低启动子功能的称启动子减效突变；如果突变发生在操纵子上，导致阻遏蛋白不能识别其作用位点，或调节基因发生突变导致阻遏蛋白功能受损，使结构基因失去负向调控作用导致组成型表达称组成型突变；发生在剪接信号点的突变将造成 mRNA 前体加工异常；转录终止点的突变将改变 mRNA 的结构；polyA 加合位点的突变将影响 mRNA 的转运；5'端非翻译区的突变将影响核糖体与 mRNA 的结合；起始密码子的突变将不能在该位点起始翻译编码蛋白等。

(二) 染色体畸变

染色体畸变意味着染色体的缺失、重复、倒位、易位等，可以导致细胞死亡。断裂或交换的部位通常不是随机分布于染色体上。杂合体指在一对同源染色体中一条是正常的而另一条发生了结构变异，而纯合体指一对同源染色体产生了相同的结构变异。如果带有裂隙、缺失、对称性互换、臂间倒位等畸变的染色体具有与正常染色体一样的着丝粒，则细胞的复制不受影响，能进行有丝分裂，畸变继续留在体内，称为稳定性染色体畸变，并可通过细胞分裂传给子代。如果染色体带有双着丝粒/环或无着丝粒，则在细胞分裂过程中容易丢失，称为非稳定性染色体畸变，由于存在有丝分裂的机械障碍或者丧失了重要的遗传物质，通常导致细胞的死亡。

S 期依赖断裂剂像紫外线一样只能诱发 DNA 单链断裂，需经 S 期复制才能在中期相细胞中出现染色单体畸变。S 期不依赖断裂剂则像电离辐射那样可诱发 DNA 的双链断裂，能在细胞周期任一时期发生作用，在随后到来的中期相观察到染色体结构的改变。

(三) 染色体数目异常

染色体数目异常称为异倍体(heteroploid),包括整倍体改变和非整倍体改变。前者包括单倍体和多倍体,后者在人类常见为单体、三体和四体,而如果某号染色体一对均缺则叫缺体。

同源染色体在第一次减数分裂联会复合体中不分离或姐妹染色单体在有丝分裂中或第二次减数分裂中因着丝粒受损未纵裂而不分离,导致纺锤体一极接受了两个同源染色体而另一极则无,细胞分裂后就形成非整倍体;由于纺锤体形成的不完全障碍或着丝粒受损,可使个别染色体在细胞分裂由中期向后期发展的过程中行动滞后,没有进入子细胞核中而丢失;也可能由于联会复合体形成障碍和第一次减数分裂时着丝粒早熟分离而产生非整倍体。

核内复制是引起整倍体的原因。在有丝分裂中,染色体及其着丝粒虽已完成正常复制,但纺锤体形成受到完全的障碍,全部姐妹染色单体不能分开,细胞不能进行分裂,在间期中形成一个有四倍体的细胞核。这个细胞在下次有丝分裂时又恢复正常的复制和分开,于是在中期细胞便可见到每 4 条染色单体整齐排列的现象。如果生殖细胞在有丝分裂期间出现核内复制,则在随后的减数分裂中出现二倍体配子,若与正常单倍体配子结合,就可形成三倍体的受精卵。如果核内复制发生于受精卵早期卵裂,则可形成具有四倍体和二倍体两个细胞系的嵌合体。

(四) DNA 损伤

狭义的遗传毒性仅指 DNA 损伤,既包括 DNA 分子一级结构中的碱基、脱氧核糖和磷酸的改变,也包括 DNA 分子二级结构、三级结构及其构象动态变化的异常改变等。其中,以碱基损伤最常见、对生物个体的影响也最严重,因为碱基序列决定了 DNA 编码的正确性。DNA 损伤的主要类型有 DNA 单链断裂、双链断裂、DNA 链内(碱基)交联、DNA 链间(碱基)交联、DNA(碱基)与蛋白质的交联,以及化学物与 DNA 碱基间的交联等。

(五) 诱重组效应

同源 DNA 序列之间的遗传重组是减数分裂过程的一部分,是遗传变异的基础。在有丝分裂中也可发生重组,只是其自然发生率非常低。能加大生物体有丝分裂重组频率的物质称重组剂。有丝分裂重组可能与某些肿瘤及其他疾患的发生有关。

第二节　遗传毒性的形成机制及影响

有些诱变物可能诱发基因突变、染色体畸变、非整倍体和多倍体等所有效应,但多数诱变物只表现一定程度的特异性。基因突变和染色体畸变的靶标主要是 DNA,而非整倍体和多倍体的靶标主要是纺锤体。目前比较公认的致突变机制是 DNA 损伤-修复-突变模式,即任何 DNA 损伤只要修复无误,突变就不会发生,如果修复错误或未经修复,损伤就固定下来产生突变。

一、DNA 损伤

在遗传毒物作用下 DNA 结构和功能发生改变,阻碍了 DNA 的复制与转录或复制与转录产物发生改变,包括 DNA 分子一级结构(脱氧核糖与磷酸损伤、碱基类似物取代和碱基烷化

等)、二级结构、三级结构及构象改变(共价结合、链间嵌入、DNA 链断裂、DNA 碱基修饰、DNA-DNA 交联、DNA-蛋白质交联等)。

DNA 损伤的原因包括机体内源性因素引起的 DNA 自发性损伤和外源性环境因素所致的 DNA 损伤两类。自发性损伤包括 DNA 合成时的碱基错配、DNA 碱基发生化学性的自发改变、细胞代谢产物活性氧类对 DNA 的氧化损伤、自由基攻击引起的 DNA 碎裂、碱基丢失和有末端糖残基片段的链断裂等。

(一) 碱基类似物在 DNA 复制时的掺入

除了标准碱基外某些类似物也能在 DNA 复制时掺入,抵抗 DNA 聚合酶 $3'\sim5'$ 外切核酸酶的校对作用。这些碱基类似物掺入后常发生酮式或烯醇式互变异构,在 DNA 复制时引起配对改变,造成碱基替代突变,所有碱基类似物引起的替代都是转换而不是颠换。

5-溴尿嘧啶作为胸腺嘧啶类似物,通常情况下以酮式结构存在能与 A 配对,但它有时也以烯醇式结构存在而与 G 配对。虽然胸腺嘧啶也有酮式和烯醇式互变异构现象,但其烯醇式的发生率极低。

(二) DNA 分子上碱基的化学修饰

有些化学物质通过修饰 DNA 碱基的化学结构而改变其配对性质。如含有 NH_2 的碱基可被亚硝酸氧化脱氨使氨基变为酮基,从而改变配对性质,造成碱基转换突变。在亚硝基作用下胞嘧啶可变为尿嘧啶、腺嘌呤变为次黄嘌呤、鸟嘌呤变为黄嘌呤。虽然糖基酶修复系统可以修复这些转变,但如果修复系统还未来得及修复时 DNA 就开始复制,则可能导致突变。

诱变剂对作用靶点的专一性程度不一样,如乙酰氨基芴仅特异地作用于鸟嘌呤的 C-8 位,在中性环境中烷化剂几乎能与核苷酸链上的全部氧和氮原子产生烷化作用,烷化硫酸酯多数攻击鸟嘌呤的 N-7 位,而烷基-N-亚硝基化合物多攻击鸟嘌呤的 O-6 位。

不同碱基被烷化的位置不一:鸟嘌呤是 N-3、N-7 和 O-6;腺嘌呤是 N-1、N-3 和 N-7;胞嘧啶是 N-3 和 O-2;胸腺嘧啶是 N-3、O-2 和 O-4;DNA 链上磷酸酯键上的氧也可烷化。鸟嘌呤 O-6 位烷化常引起碱基错配,由原来的 G∶C 转换为 A∶T,诱发肿瘤。鸟嘌呤 N-7 位的烷化一般不致引起错配,但有时会发生碱基脱落,导致移码突变。如果在碱基缺失的互补链相应位置随机接上一个碱基,可能导致转换或颠换。鸟嘌呤的 N-7 位有时也可以烷基化成带一个正电荷的季胺基团,从而促进第一位氨基上氢的解离,使 G 不再与 C 配对而与 T 配对。

大部分的无嘌呤位点可以被无嘌呤内切酶系统所修复,但如果复制在修复之前进行则在无碱基位置上可以插入任何一个碱基。N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍是一种诱变能力很强的烷化剂,产生的突变体常常含有多位点突变,而且这些突变位点往往在同一个基因内或相邻基因内成簇分布,可以使一个群体中任何一个基因的突变率高达 1%。

(三) DNA 加合物和交联分子的形成

亲电子剂极易与蛋白质或核酸等大分子物质中的亲核位点发生共价结合,形成加合物或交联分子。生理条件下 DNA 是以双链互补的形式形成多级螺旋结构并与组蛋白结合,从而使这些部位得以隐蔽不易受伤,但仍有相当数量的基因处于暴露状态。核小体之间的连接段及处于转录状态/复制状态的 DNA 都是易受损伤的部位。黄曲霉毒素 B 和苯并(a)芘经生物活化后与 DNA 发生共价结合形成加合物,可诱发突变并最终致癌。

有些化学物如亚硝酸、丝裂霉素C、芥子气等，可使DNA分子上一条链的碱基与互补链上的相应碱基形成共价连接(DNA－DNA交联)，使得DNA在复制过程中不能解链，影响复制和转录，甚至导致细胞死亡。

紫外线和电离辐射可使两个相邻的嘧啶相互交联形成嘧啶二聚体，生物毒素、多环芳烃和芳香胺类可使DNA形成大加合物，使DNA立体构象发生明显变化，阻断DNA复制和转录。烷化剂和亚硝基化合物使碱基发生甲基化、乙基化等烷化加合反应，形成小加合物，它们虽不阻断DNA复制，但易导致碱基的错误配对。DNA的损伤还可发生在磷酸核糖骨架上，导致磷酸二酯键的断裂，单链断裂能被细胞所修复，而双链断裂往往引起染色体缺失或重排。而多功能烷化剂可使DNA链内、链间或DNA与蛋白质之间发生交联，发生交联后的DNA链不易修复或发生易错修复。

(四) 嵌合剂的致突变作用

吖啶类染料原黄素、吖啶橙、吖黄素等分子大小与碱基相近，长度是DNA单链相邻碱基距离的2倍，能以静电吸附的形式嵌入碱基之间或DNA双螺旋结构的相邻核苷酸之间称为嵌合剂。如果嵌入到新合成的互补链上，就会使之失去一个碱基；如果嵌入到模板链的两碱基之间，就会使互补链插入一个多余的碱基，引起移码突变。

(五) 转座成分的致突变作用

生物体内数百至数千bp大小的转座成分可以通过一种复杂的方式复制，一个拷贝留在原位，而另一个拷贝插入到另一位点，复制插入到第二个部位的过程称为转座。DNA病毒和反转录病毒都可整合到DNA中，导致基因失活或结构改变。较大DNA片段的插入不仅可能引起移码突变，还可能导致插入处基因的中断、失活及结构改变，甚至可能带入有害基因增加基因突变频率。

(六) 增变基因

生物体内有些基因与整个基因组的突变率相关，当这些基因突变时，整个基因组的突变率明显上升，如DNA聚合酶的$3'\sim5'$校对功能丧失或降低，或*dam*基因和*mut*基因的错配修复功能丧失都引起突变率的升高。

(七) DNA构象的改变

Hoffmann于1991年指出，不仅DNA的化学变化与突变有关，构象改变也与突变有关。例如，乙酰氨基芴(AAF)和N－2－氨基芴(AF)都作用于鸟嘌呤的C－8位形成加合物，但结果有异。AAF主要导致移码，而AF主要引起颠换。Bichara于1985年发现在形成加合物时AAF插入到DNA中使鸟嘌呤凸出，发生DNA双螺旋的局部变性，而AF却保持在双螺旋之外不引起变性。另外，AAF可对GGCGCC序列中的某一鸟嘌呤作用形成加成物，在产生移码突变的同时还使局部的DNA构象发生改变。

(八) 突变热点

从理论上讲DNA分子上的任何一个碱基都能发生突变，但实际上突变位点并非完全随机分布，基因中极易受攻击的位置称为突变热点。形成突变热点的主要原因是5－甲基胞嘧啶(5mC)，5mC在突变剂的作用下脱氨氧化生成T，形成G·T的不配对状态。如果这种状态发生在正在复制的模板链上，则很快引起突变；如果发生在DNA复制期的新生链上，就可以被错配修复系统所修复。如果发生在DNA的非复制期，由于两条链的甲基化程度相同，错配

修复系统就失去了判别标准，只能随机地切除一个，这样就有一半的可能发生突变。

突变热点与突变剂有关，不同的突变剂作用机制不一样，DNA 序列可以使某个碱基对突变剂更敏感，所以不同的突变剂引起的突变热点也有区别。一般认为，染色体断裂并不是随机分布于染色体的任何部位，而常发生在常染色质和异染色质的联结点。常染色质修复较快而少畸变，异染色质修复较慢且受阻滞而较多出现畸变。诱变剂对染色体的损伤有一定特异性，如丝裂霉素 C 是已知唯一能损伤着丝粒的化学物，其对人染色体的损伤主要分布在第 1、9 和 16 号染色体的次缢痕。

二、DNA 损伤的修复

一般认为蛋白质新陈代谢快、严重受损的蛋白质在失去功能后将被分解，蛋白质损伤对机体的危害较小。但是，如果诱变剂攻击 DNA 聚合酶、错配修复酶等与 DNA 合成和修复有关的酶系统也可间接导致 DNA 损伤，从而发生基因突变或染色体畸变。

1. *光修复* 紫外线损伤可形成胸腺嘧啶二聚体引起突变，光裂合酶可切除 DNA 上的嘧啶二聚体，将毗连的嘧啶接回原结构上。

2. *"适应性"反应* 鸟嘌呤 O－6 位烷化易造成碱基错配。O－6 烷基鸟嘌呤- DNA 烷基转移酶可将鸟嘌呤 O－6 位的甲基转给蛋白质使鸟嘌呤恢复正常碱基配对。

3. *核苷酸切除修复* 核苷酸切除是所有生物体内最常见的修复机制，基本上可修复所有种类的 DNA 损伤。在 DNA 损伤点的两侧切开损伤链，除去含有受损的寡核苷酸链，切除留下的间隙在修复聚合酶作用下，以对应的 DNA 链为模板合成填补，经 DNA 连接酶封闭，恢复原有 DNA 序列。

4. *碱基切除修复* 比核苷酸切除的专一性更强。DNA 糖苷酶可识别异常的碱基，通过切断碱基与脱氧核糖之间的键使受损碱基脱落，产生一个无嘌呤或无嘧啶位点(即 AP 位点)。由 AP 内切酶将 DNA 链切断，在聚合酶及连接酶作用下完成修复。

5. *错配修复* 可识别并除去在复制过程中错误地出现或者通过碱基活性修饰而形成的错配碱基对。

6. *复制后修复* 通过填补损伤部位使复制得以继续进行，但 DNA 损伤部位仍然存在。严格说来复制后修复不是修复，而是一种以容忍损伤继续存在和高突变率情况下，换取细胞继续生存的耐受过程。

三、整倍体和非整倍体的形成

染色体复制异常或行动异常是染色体数目异常的原因。如果同源染色体在第一次减数分裂联会复合体中不分离或者姐妹染色单体在有丝分裂或第二次减数分裂中因着丝粒受损而不分离，使得纺锤体一极接受了两个同源染色体或两条姐妹染色单体而另一极没有，细胞分裂后就形成非整倍体。如果纺锤体形成不完全障碍或着丝粒受损，在细胞分裂由中期向后期发展的过程中使个别染色体行动滞后没能进入任一子细胞的核中，而使一个子细胞核丢失一条染色体。

对于具体的作用机制目前尚未完全明晰，不同的化合物作用机制也不一致。如秋水仙碱、鬼臼素、长春花碱和长春新碱可与微管蛋白结合妨碍微管的正确组装，发生细胞分裂的完全抑制；苯基汞与着丝粒微管结合、甲基汞与极间微管结合，使细胞分裂发生不完全抑制；灰黄霉素、秋水仙碱、长春花碱等能与微管结合蛋白结合，导致组装好的微管解聚；氨基甲酸酯使微管

失去定向能力；秋水仙碱妨碍有丝分裂早期两对中心粒的分离和向两极移动过程等。

四、影响遗传毒性的因素

（一）损伤的类型

不同器官和细胞修复能力不同，而同一细胞内不同基因片段的损伤得到修复的机会也不均等，如表达基因优于静止基因、调控基因优于功能性基因。

DNA损伤类型不同修复途径各异，DNA损伤的修复可分为染色体修复、基因修复和核苷酸修复，不同的修复突变率有差异。细胞在G1晚期存在检测DNA完整性的关卡，使得带DNA损伤的细胞无法进入S期；细胞内的错配修复体系，专门用于修正DNA合成时配对错误的碱基。直接修复、切除修复和错配修复基本属于无误修复，而重组修复属于易错修复。

DNA上的嘧啶二聚体和大加合物会阻断DNA的半保留复制，如果发生双链交联，DNA合成将终止。如果局限在一条链上，聚合酶复合体将跳过这一障碍重新开始合成新的DNA片段，在新合成的DNA链上留下一段缺口。以含损伤链为模板合成的带缺口DNA分子，可能在半保留复制完成后的基因重组过程中，以两条姐妹染色单体DNA分子之间的单链互换方式修复。继续保留在子链DNA上的损伤位点可能在细胞进入下一个S期前经切除修复。由于子链上的缺口不是以正常的互补链DNA为模板进行的修复，这种修复过程的准确性很差，容易引发基因突变。这是生物在遇到某些DNA复制障碍时避免死亡的一种应激机制。当一对姐妹染色体或一对同源染色体中有一条结构正常时可以通过基因重组途径修复。

（二）DNA损伤修复基因的遗传变异

当参与DNA修复的基因发生突变时，细胞内各种基因包括肿瘤相关基因的突变频率将大幅增加。当细胞内的另外一个等位基因发生突变时很容易癌变。错配修复基因遗传性缺陷，可能与肿瘤细胞的进展有关。例如，它们能将恶性结肠癌的潜伏期缩短为3～5年，而正常人需要20～40年。肿瘤细胞中的微卫星体不稳定性增加，可能是细胞错配修复功能降低的表现。

（三）细胞增殖与突变

在突变形成过程中，细胞增殖是DNA加合物转变为永久性突变的必要步骤。细胞增殖还能增强诱变物的效率，细胞增殖剂量的诱变物，因为缩短了可用于清除DNA加合物的时间，其效力比不诱致细胞增殖剂量时高得多。

五、遗传毒性的后果

遗传毒性的后果因遗传毒性的靶标及类型而异。体细胞发生突变，只影响接触诱变剂的个体，而不影响后代。生殖细胞发生突变则影响后代。

同义突变既无益处，也无害处。非同义突变可分为3类：第一类不影响产物的功能发挥；第二类对机体有益；第三类对机体有害或致命，该类后果占多数。

从进化的观点看，突变与生物的进化、新种的产生有密切关系，对生物种群的生存与进化非常重要。但是，目前人们尚不能有效控制突变的方向，而且多数情况下对个体而言，短期内突变的频率过高往往是有害的（图6－1）。

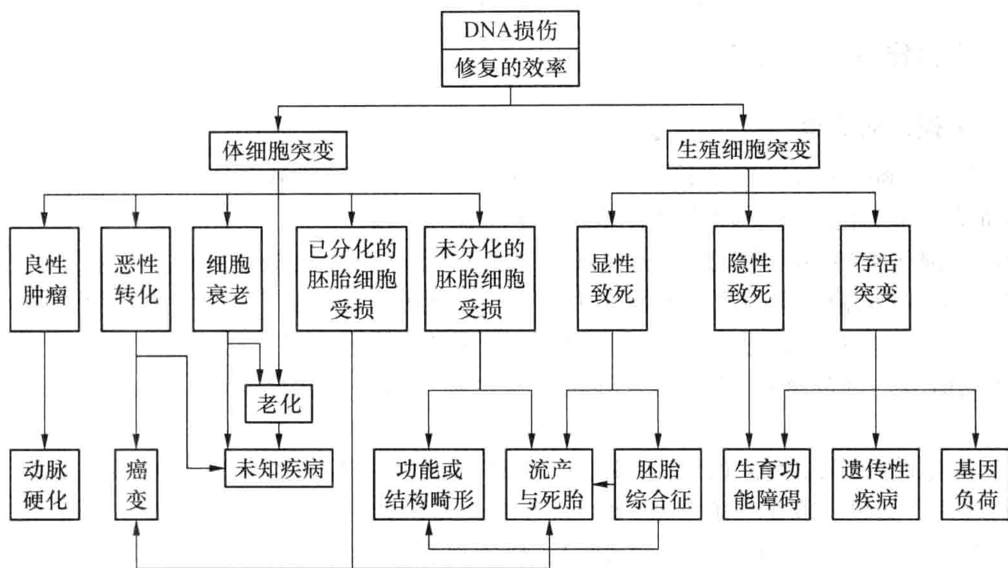


图6-1　突变后果示意图

(一) 体细胞突变的后果

体细胞突变可导致衰老、肿瘤、动脉粥样硬化和致畸等。

1. *肿瘤*　大多数致癌环境因素都是通过影响遗传基因而起作用,如癌基因(oncogene)、抑癌基因(tumor suppressor gene)和增变基因(mutator gene)。多数肿瘤的基因变异发生在体细胞,但也有少数肿瘤是因为亲代基因的变异而发生。致癌物诱致的遗传学改变包括基因突变、基因扩增、染色体重排和非整倍性。

2. *衰老*　关于衰老的学说众多、衰老机制复杂,目前尚未达成共识。如有人认为衰老由于体细胞基因组中的突变累积以及功能丧失增加所致;也有人根据放射线可诱发突变,而提出衰老可能是由于长期暴露于低剂量、天然本底的放射线或环境诱变物所致;内外环境因素引起的DNA损伤通过DNA的复制、修复和重组,最终产生突变,突变的累积可能导致细胞死亡、细胞转化和细胞衰老。

3. *动脉粥样硬化*　关于动脉粥样硬化的致病机制目前尚不完全清楚。1973年Benditt根据有关动脉粥样硬化斑内细胞是单克隆性的发现提出了一种假说,即动脉粥样硬化斑可被看作为动脉壁的一种良性单克隆赘生物,认为动脉粥样硬化起始于某一突变或病毒感染,经转化形成增殖克隆的祖细胞。

(二) 生殖细胞突变的后果

生殖细胞的突变可以是致死的也可以是非致死的。有些非致死突变会在生物的世代传递、选择过程中固定下来,增加遗传负荷。

1. *显性突变*　有些显性突变引起受精卵或胚胎在胎儿成熟之前死亡,称为显性致死突变,这种突变对生物种基因库没有影响;而有些显性突变并不引起胚胎的死亡,只在子代出现一定的特征,如多趾(指)病、先天性成骨不全、遗传性舞蹈病等。显性遗传可传给后代,影响生物种基因库。

2. *隐性突变*　杂合子不表现特征只有纯合子才表现特征的突变,如白化病、半乳糖血症、

全色盲、先天性聋哑等。隐性突变大大增加了人群中致病基因的携带者数量,影响人类素质,增加遗传负荷,影响人类基因库。

(三) 遗传毒性后果的形成机制

维持基因组的稳定,对细胞的生存和增殖至关重要。遗传毒性物质可能损害机体细胞基因组的完整性,导致细胞周期异常,影响细胞的增殖和分化。遗传毒物可以通过许多途径诱发细胞凋亡。例如,DNA 损伤可经 p53 诱发细胞凋亡;紫外线和烷化剂可激活细胞表面 TNF 和 Fas 受体;有些遗传毒物可通过促进细胞内活性氧生成,引发细胞氧化应激,导致凋亡;线粒体膜通透性的改变也可触发细胞凋亡。

第三节　遗传毒性的检测方法

用于识别生殖细胞诱变剂、体细胞诱变剂、潜在致癌剂的方法超过 200 种。根据遗传毒性终端指标可把它们分为三大类:基因突变、染色体畸变、DNA 损伤标志检测。

一、基因突变的检测

基因突变的检测主要有正向和反向两类。正向突变改变了野生型基因,使得有关基因失活而表现出可检测的表型变异。相反,回复突变是通过突变使原来已经突变失活的基因功能恢复,从而表现出野生型的表型。

微生物突变分析检测速度快、费用低、突变检出相对容易,在遗传毒性物质的初步筛检中占有重要地位,如沙门菌/组氨酸回复突变实验(Ames 实验)、大肠杆菌 WP2/色氨酸回复突变实验、酵母菌正向/回复突变分析等。哺乳动物细胞突变分析及昆虫突变分析,像果蝇性连锁隐性致死实验以及果蝇的体细胞突变分析等。哺乳动物体内突变分析虽然昂贵且敏感性低,但体现了受试物在整体动物中的真实效应,并能体现整体动物对受试物的吸收、分布、代谢、受试物及其代谢物的排泄状况,在安全性评价中起着举足轻重的作用。常用的检测方法有生殖细胞突变分析如小鼠特异基因座测试,体细胞突变分析如小鼠体细胞皮毛斑点突变分析以及转基因动物与突变检测等。

二、染色体畸变的检测

染色体畸变包括染色体结构和数目的改变,结构改变包括断裂、断片、倒位、易位、重复、无着丝粒环、双或多着丝粒染色体等;数目异常有整倍性改变也有非整倍性改变。缺失(染色单体缺失除外)需进行核型分析或用流式细胞仪,倒位、插入、重复及易位需进行显带,而染色体分离异常则要在染毒后经过一次细胞分裂才能发现。一般用高等生物检测染色体的结构异常,用微生物、哺乳动物体外细胞和哺乳动物体内系统检测染色体的数目异常。

染色体结构畸变的检测可以进行微核实验以及姊妹染色单体交换。哺乳动物体内细胞遗传学分析体现了哺乳动物的代谢过程、DNA 修复和药物动力学特征,实验考虑了有效剂量、最适途径、染毒和取样的间隔时间、足够的动物数目和分析细胞等因素。体内微核测试通常在啮齿类骨髓嗜多染红细胞或外周血细胞中进行,而生殖细胞微核分析还能分析减数分裂过程中的染色体损伤。可使用 C 分带技术、着丝粒探针实施的 FISH 技术、动粒蛋白的 CREST 抗体免疫技术等鉴别微核是否含有着丝粒 DNA 或动粒蛋白。显性致死实验通过对雄性动物染

毒，观察一个精子发育周期中各个阶段雌鼠胚胎早期死亡发生率的变化，判断受试物对雄性生殖系统的损害及敏感阶段。

三、染色体数目改变的检测

多倍体动物通常只能生存一代，而非整倍体可引起自发流产、子代遗传异常和癌变，故检测多倍体的实际意义不如非整倍体。

非整倍体的发生与中心粒成熟、复制与分离、着丝粒复制分离、纺锤体结构与功能、微管蛋白组装与解聚、细胞膜及某些膜受体的功能、细胞信号传递系统、拓扑异构酶Ⅱ的功能抑制等相关。可以根据标记染色体异常分离后子代菌落的性状改变来观察。如酵母菌 D6 在完全培养基上形成红色菌落并对放线菌酮敏感，而如果携带的 7 号染色体丢失，则表现为白色菌落并对放线菌酮有抗性；构巢曲霉杂合二倍体菌株 Pl 正常情况下菌落为亮绿色，当携带的 1 号染色体丢失时则出现黄色菌落；将 X 及 Y 染色体上带有选择性标记的黑腹果蝇染毒后观察后代的表型，来判断标记染色体在形成配子过程中是否发生了异常分离。也可以利用纺锤体和染色体的分化染色、着丝粒特异性 DNA 探针与微核杂交、抗动粒抗体检测微核中的动粒等来检测非整倍体。

四、DNA 损伤的测试

DNA 损伤的检测能为识别遗传危害提供证据，但不能成为评价潜在危害人体健康的独立指标，需要有基因突变或染色体畸变分析的结果支持。

例如：单细胞凝胶电泳试验、脉冲场凝胶电泳用于检测 DNA 断裂；酿酒酵母 D7 菌株可以同时检测有丝分裂交换和有丝分裂基因转换；体细胞重组过程能使杂合的体细胞产生纯合子，导致杂合状态的隐性基因在子代得以表达；DNA 加合物的检测可以采用免疫法和 ^{32}P 后标记法，以标记物掺入细胞量的增加来判断程序外 DNA 合成实验等。

五、现代分子生物学技术在基因突变检测中的应用

基因突变检测的“金标准”是 DNA 测序。而对基因突变的筛查，可以使用如 PCR-单链构象多态性分析、变性梯度凝胶电泳、双链构象多态分析法、特异性等位基因扩增、变性-高压液相色谱分析等方法；也可以采用化学裂解错配碱基法、酶错配切割法、限制性酶切位点突变分析、微卫星 DNA 分析、单核苷酸多态性分析、内切酶片段长度多态性分析、DNA 芯片技术等来筛查。

（韩光亮）

第七章　生殖毒性与发育毒性

经历了一系列重大事件后人们对先天缺陷和环境的关系有了深刻的认识。1940年澳大利亚发生风疹大流行，次年出生婴儿中先天性白内障、耳聋、智力不全和先天性心脏病发生率增高。1945年在日本广岛和长崎，受到原子弹核辐射的胎儿出生后患小头畸形和智力低下，婴儿一年内死亡率达25%。1950年代日本水俣湾甲基汞中毒发生先天性水俣病。1960～1962年间反应停(thalidomide)作镇静剂减轻早孕反应，引起灾难性短肢畸形事件。1970年发现，母体妊娠18周以前服用己烯雌酚，可诱发女性子代阴道和子宫颈透明细胞腺癌；男性子代发生附睾囊肿、睾丸囊性硬结、小阴茎畸形及精子异常。此发现推动了对经胎盘致癌和内分泌干扰物的研究。1970年代Jones描述了胎儿酒精综合征(FAS)，对乙醇的发育毒性有了进一步的了解。孕期吸烟可能引起自然流产、围生期死亡、婴儿猝死综合征危险性增加、低出生体重等。可卡因暴露可引起多种不良发育效应，如胎盘早期剥离、小脑畸形，异常前脑发育等。过量的视黄酸可引起胚胎面部、四肢、心脏、中枢神经系统和骨骼的畸形。以上事件的发生推动了化学品和环境因素对妊娠不良结局的研究。

成功的妊娠结局在一般人群中发生频率之低令人惊讶。不良结局包括着床后的妊娠损失，估计占31%；主要的出生缺陷在出生时为2%～3%，而在出生后1岁时增加到6%～7%；1岁之前的婴儿死亡率为1.4%；神经功能异常为16%～17%。因此，所有人类的受孕只有不到一半能产下完全正常健康的婴儿。导致这些不利后果的原因大多不清楚。Brent和Beckman(1990)将15%～25%的人类出生缺陷归因为遗传，4%归因为母体状况，3%归因为母体感染，1%～2%归因畸形，<1%归因于化学药物或其他环境因素，65%归因于未知病因。

对生殖发育有害的化学品不仅能作用于胚胎的器官形成期造成形态畸形，对妊娠前期的影响还可发生不育，对胚胎的毒效应可在出生后观察到发育、行为、代谢功能的障碍或子代肿瘤发生率增高。所以，有必要综合考虑有害因素对母体和父体的影响，将形态致畸与神经行为发育毒性结合起来进行观察，将生殖毒性和发育毒性结合起来进行研究。

第一节　概　　述

一、基本概念

有害因素造成对亲代的生殖功能及对子代发育过程的有害影响的作用分别称为生殖毒性

和发育毒性。两者关系密切，侧重点不同。生殖毒性着重研究外源化学物对亲代生殖功能的有害作用，发育毒性着重研究外源化学物对子代生殖功能的有害作用。

生殖和发育过程是完整连续的过程，为测定各阶段暴露所致的毒效应，其观察应持续一个完整的生命周期，该周期可以分为以下 6 个阶段。各阶段和子代的暴露的途径见图 7－1。

A：从交配前到受孕（成年雄性和雌性生殖功能，配子的发育和成熟、交配行为、受精）。

B：从受孕到着床（成年雌性生殖功能、着床前发育、着床）。

C：从着床到硬腭闭合（成年雌性生殖功能、胚胎发育、主要器官形成）。

D：从硬腭闭合到妊娠终止（成年雌性生殖功能、胎仔发育和生长、器官发育和生长）。

E：从出生到断奶（成年雌性生殖功能、幼仔对宫外生活的适应性、断奶前生长和发育）。

F：从断奶到性成熟（断奶后发育和生长、独立生活的适应能力、达到性成熟）。

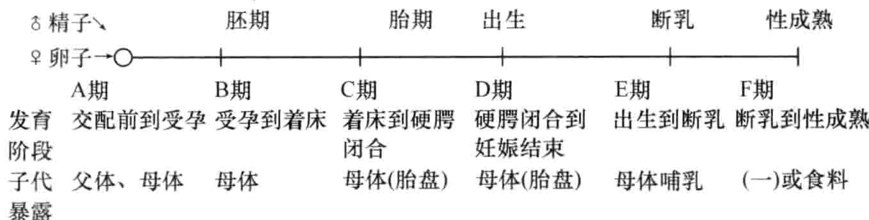


图 7－1　从生殖和发育毒理学角度生命周期的 6 个阶段及子代的暴露途径

（引自周宗灿主编. 毒理学教程. 第 3 版. 北京大学医学出版社，2010）

（一）发育毒性

发育毒性（developmental toxicology）指出生前经父体和（或）母体接触外源性理化因素引起的在子代到达成体之前内出现的有害作用。能造成发育毒性的物质称为发育毒物（developmental toxicant）。发育毒物应是在未诱发母体毒性的剂量下产生发育毒性的物质。发育毒性的主要表现如下。

1. 发育生物体死亡（death of the developing organism）　受精卵未发育即死亡或胚泡未着床即死亡，或着床后生长发育到一定阶段死亡，然后被吸收或自子宫排出。

2. 生长改变（altered growth）　生长迟缓（growth retardation），即在发育毒物的影响下，胚胎与胎仔的发育过程较正常缓慢，低于正常对照组均值的两个标准差。

3. 功能缺陷（functional deficiency）　器官系统、生化、免疫等功能的变化。功能缺陷往往要在出生后经过相对时间才能诊断，如听力或视力异常、行为发育迟缓等。

4. 结构异常（structural abnormality）　由于发育毒物的干扰，活产胎仔/胎儿出生时某种器官表现出形态结构异常，包括畸形和变异。畸形（malformation）是指永久性的结构改变，该改变可能会对生存、生长或功能有害。变异（variation）是用来表示不同于正常结构的改变，该改变可能不会对生存或健康产生有害的影响。变异和畸形的区别较为困难，因为从正常到不正常是一个连续的反应过程。

（二）生殖毒性

生殖毒性（reproductive toxicology）指能够对人类的生殖器官、相关的内分泌系统和妊娠结局产生的有害作用。这些损害作用包括对性成熟、配子发生（gametogenesis）及其转运、性周期、性行为、受精、着床、胚胎形成与发育、妊娠、分娩和哺乳等不良影响或依赖于生殖系统完

整性的其他功能的改变。

（三）生殖毒理学

生殖毒理学（reproductive toxicology）是指研究外源性化学物损害生殖过程的机制、规律及其毒作用对后代影响的学科。研究范围包括外援化学物对生殖细胞发生、卵细胞受精、胚胎形成、妊娠、分娩和哺乳过程的损害作用及其评定等，评定方法即为生殖毒性试验（reproductive toxicity test）。

（四）致畸作用

致畸作用（teratogenesis）是指发育毒物影响胚胎发育和器官分化，使子代出现先天性畸形的作用。能引起畸形的因子称为致畸物或致畸源。

（五）不良妊娠结局

不良妊娠结局（adverse pregnancy outcome）是指妊娠后不能分娩出外观和功能正常的子代，包括流产、死胎、死产、宫内发育迟缓、发育异常、新生儿和婴幼儿期死亡等。

（六）胚体-胎体毒性

外源性理化因素造成的孕体着床前后直到器官形成期结束的有害影响称为胚体毒性（embryotoxicity），孕体器官形成后的有害影响为胎儿毒性或胎体毒性（fetotoxicity）。在动物发育毒性实验中，通常不区分胎儿与胚体，笼统称为胚胎毒性（embryofetal toxicity）。

二、生殖与发育毒性的特点及影响因素

（一）毒性特点及靶器官

生殖与发育过程包括配子（精子与卵子）的发育形成、交配、受精、合子形成与植入、胚胎形成与发育、分娩等阶段。生殖与发育过程的每个阶段涉及的细胞或器官都可能成为外源化学物毒作用的靶点。外源化学物对生殖与发育过程的损害主要有以下 3 个方面。

1. 亲性腺作用（性腺毒性） 某些化学物可作用于性腺，影响生殖器官的发育与性腺成熟，或造成性腺组织病理学改变。例如，氯乙烯单体可使睾丸曲细精管萎缩，氯化镉可引起小鼠卵巢出血、排卵抑制。某些化学物可影响配子的发生、增殖和成熟，使生殖细胞数量减少、功能减退及突变。例如，过量暴露二硫化碳的男工多见性功能减退，表现为性欲下降、阳痿。生殖细胞受损的结果是不育、流产、死胎、畸胎和其他先天缺陷。目前已知的亲性腺毒物有多种，包括固醇类药物、化疗药物、有机磷和有机氯农药、镉、铅、汞和二硫化碳等。

2. 亲胚胎毒性（embryo-fetal toxicity） 某些化学物可作用于胚胎，对胚胎发育产生有害作用。某些化学物可以引起胚胎的体细胞突变，引起的畸形不具备遗传性。某些化学物可以降低胚体对必需营养素的利用度，如氨基蝶呤降低胚体对叶酸的利用度。胚体毒性、胎体毒性是指由出生前暴露引起对孕体不同阶段的任何有害影响，包括结构和功能异常，或这种影响在出生后的表现。

3. 亲胎盘毒性（胎盘毒性 placental toxicity） 某些化学物可对胎盘造成损伤，改变胎盘血流量，降低胎盘对营养物质的转运，特意地干扰胎盘功能（如内分泌和代谢功能）。如甲基汞改变人胎盘滋养层微绒毛对不能代谢的氨基酸的摄取，导致功能障碍。

（二）发育毒性的敏感期和终末点

不同的发育毒物可作用于不同发育阶段，产生不同的效应。因此，孕体发育不同阶段接触

各种发育毒物所引起的发育毒性表现不一样(表 7-1)。最容易引起畸形的阶段是器官形成期。

表 7-1 各发育阶段暴露与妊娠结局之间的关系

发育阶段	靶系统	观察到的效应
精子	整个孕体	低出生体重;新生儿期死亡
卵母细胞	整个孕体	细胞死亡;先天畸形
胎盘	心血管系统 代谢	干扰主动转运;改变母体-胎体循环 改变营养素的生物合成;外源化学物生物转变改变
胚体	整个孕体	子宫内生长迟缓;先天畸形;死亡
胎体	整个孕体 生殖系和肾 骨	生长迟缓;死亡;经胎盘致癌 泌尿生殖器畸形 骨骼畸形
婴儿	CNS 生殖系统 呼吸器官 肌肉组织 整个机体	神经行为异常;断瘾症状;心理能力改变 生育力改变 呼吸抑制 肌张力减退 新生期死亡

(引自王心如主编. 毒理学基础. 第 6 版. 人民卫生出版社,2013)

1. 着床前期　又称分化前期,从受精时算起,到完成着床之前。其期限在人类为第 11~12 天;啮齿动物为前 6 天。卵子受精后,细胞迅速分裂而形成胚囊,分化很少,受损的是相对未分化的细胞。一般认为,此时很少发生特异的致畸效应,通常是未分化细胞受化学毒物损伤而致胚泡死亡,称为着床前丢失(preimplantation loss)。

2. 器官形成期　着床后孕体即进入器官形成期,直到硬腭闭合。还可细分为原肠胚形成期和各器官结构的形成期。人是 3~8 周。一般认为大鼠、小鼠、兔的着床时间为妊娠第 6~7 天,硬腭闭合时间为妊娠第 15~18 天。器官形成的迅速变化需要细胞增殖、细胞移动、细胞与细胞交互作用和形态发生的组织改造。研究表明,器官形成期是发生结构畸形的关键期(critical period),也称致畸敏感期。各物种妊娠期长短不一,敏感期的时间也不同。图 7-2 表示人、大鼠、家兔的致畸作用敏感期及不同器官诱发畸形的“靶窗”。器官形成期也可能引起胚胎死亡。一胎多仔动物(如啮齿类)胚胎死亡后被吸收,称为吸收胎(resorption),在人和灵长类则以流产告终。这一时期,外源化学物表现出发育毒性,以结构畸形最突出,也可有胚胎死亡、生长迟缓。

3. 胎儿期　器官形成结束(以硬腭闭合为标志)后进入胎儿期(人类从受精第 56~58 天起),直到分娩。胎儿期以组织分化、生长和生理学的成熟为基本特色,在胎儿期接触发育毒物很可能对生长和功能成熟产生效应,如免疫系统、中枢神经系统和生殖器官的功能异常,包括行为的、精神的、运动的缺陷和生殖力降低等。这些临床表现出生前不明显,需要出生后对子代仔细观察和测试。某些结构变化在胎儿期也能发生,但是通常是变形(干扰先前正常的结构)或异常而非畸形。在胎儿期毒性暴露的一些效应可能需要多年才变得明显。所以,胎儿期外源化学物的不良作用主要表现为全身生长迟缓、特异的功能障碍、经胎盘致癌,偶见死胎。

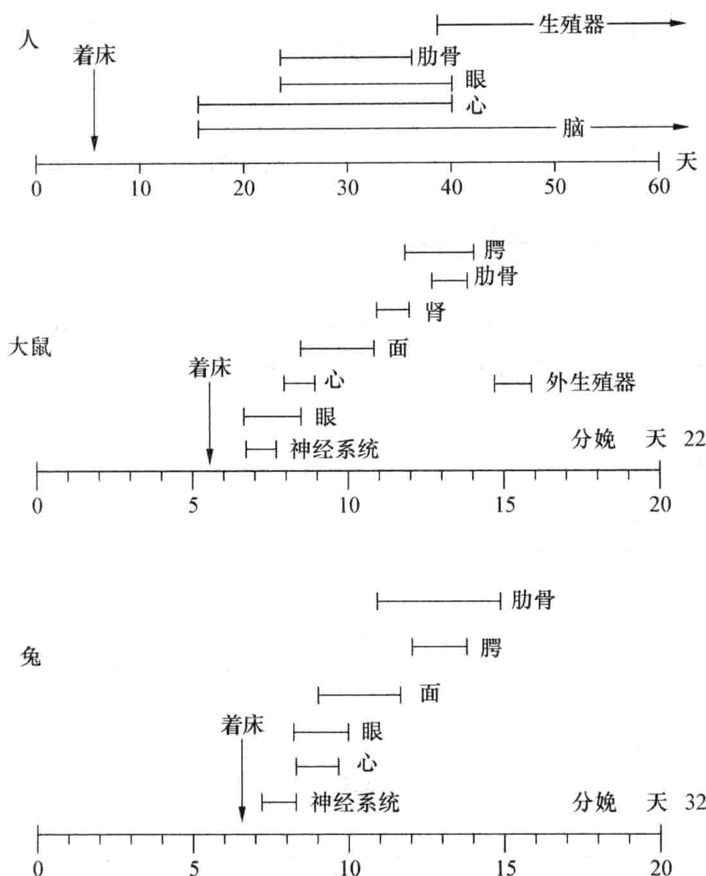


图 7-2　人、大鼠和家兔的致畸作用敏感期

（引自 Ecobichon DJ. The Basis of Toxicity Testing. 2 ed. CRC Press，1997）

4. 围生期　产前、产时、产后时期，包括妊娠后期、分娩过程和新生儿早期。国内定义为胎龄满 28 周至出生后 7 天，是小儿生命受到威胁、最为脆弱的重要时期。该期对致癌物最为敏感，原因是细胞生长速度快，药物代谢酶个体发育不全，免疫监视功能较低，许多儿童期肿瘤（如急性淋巴细胞白血病、神经母细胞瘤、骶骨前畸胎瘤等）的发生都可能与这段时间接触有害因素有关。

5. 出生后发育期　自胎儿娩出脐带结扎时开始，人类发育进入新生儿期、婴儿期、幼儿期、学龄前期、学龄期直到青春发育期。早期阶段，人类生长发育及其旺盛，但器官系统的功能不够成熟完善。遗传代谢缺陷病、内分泌障碍、染色体畸形与遗传直接相关。环境、营养、家庭和社会因素都会对生长潜力产生影响。这期间颇受关注的是免疫、神经行为发育毒性和儿童期肿瘤。如幼儿出生后经母乳、空气、食物、玩具和环境中摄入过量铅，会引起认知功能发育和学习障碍。5 岁以下儿童在家庭内接触氯氰菊酯和有机磷类杀虫剂，脑癌发生的相对危险度增高。

（三）发育毒性的剂量-反应模式和阈值问题

1. 剂量反应模式　发育毒性的剂量-反应关系十分复杂，可因化学物的类型、暴露时间和剂量而改变。常见的有以下 3 种类型（图 7-3）。

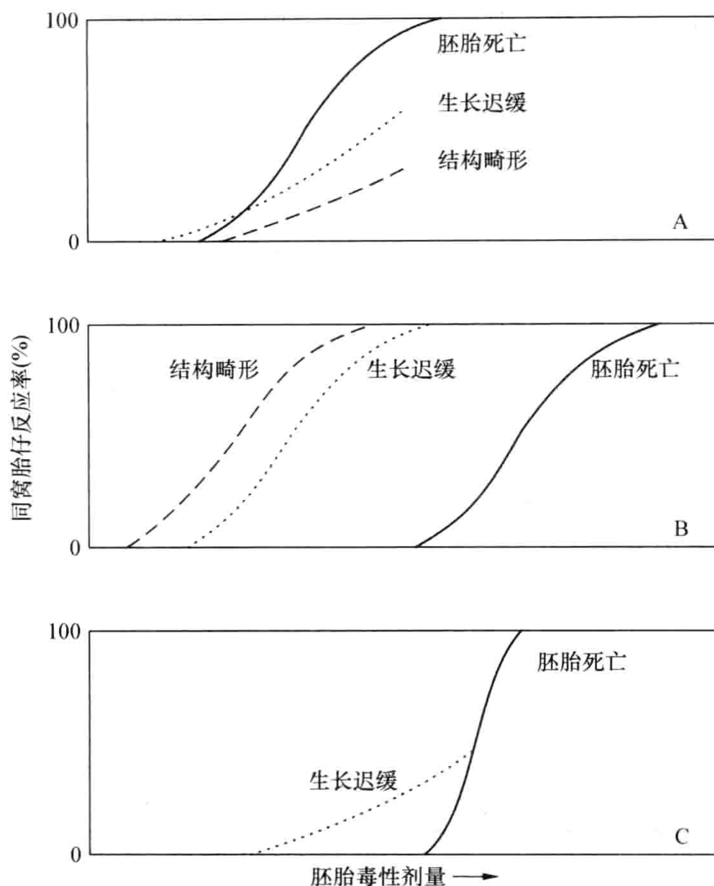


图 7－3　发育毒性的剂量-反应模式

(引自王心如主编. 毒理学基础. 第 6 版. 人民卫生出版社, 2013)

(1) 常见型(图 7－3A):低剂量可引起生长迟缓、胚胎吸收和畸形,剂量增加,胚胎死亡占优势,直至整窝胚胎死亡。这种反应类型较常见,多为细胞毒性致畸物,包括烷化剂、抗癌药及很多致突变物。

(2) 剂量-反应曲线陡峭的致畸作用(图 7－3B):在远低于胚胎致死剂量下即可出现致畸,甚至全窝致畸,致畸胎儿常有生长迟缓。当剂量增加到远远超过全窝畸形时才出现胚胎死亡,后者的剂量范围常与明显的母体毒性剂量范围重叠。这种模式表示受试物有高度致畸作用。

(3) 有生长障碍和胚胎死亡但不伴随畸形(图 7－3C):有生长迟缓和胚胎致死但没有畸形发生。往往生长迟缓首先出现,曲线较平缓,较大剂量才出现胚胎死亡,其曲线较陡,近于“全或无”,表明胚胎的存活有明显的界限值。

2. *发育毒性阈值(阈剂量)*　母体的暴露剂量。由于胚胎生长的高可塑性、细胞内稳定机制和母体的代谢防御功能,理论上是小于母体暴露剂量不会发生不良的妊娠结局。发育毒性是否真正有阈值尚未清楚,原因是实验动物样本数的限制很难通过实验找出一个发生率很低的剂量-反应关系,而且现代研究认为基因突变是发育异常的机制之一,关键基因点突变可由一次攻击或一个分子诱导,导致基因产物有害变化和发育异常,也就是说,一个化学物的任何

水平暴露，甚至一个分子都有可能导致发育毒性。

在化学物与人群健康之间的危险性评估中，一个群体的阈值是由该群体中最敏感个体的阈值决定的，但是，由于人群的个体差异，必须考虑到个体阈值和群体阈值存在的差异。

（四）发育毒性的影响因素

发育毒性是孕体在细胞和器官水平的损伤，影响因素可能是对胚胎/胎盘的直接作用、对母体或（和）胎盘的间接作用或其他直接和间接效应等联合作用产生发育危害。不利的母体因素（如宫内血流下降、贫血、糖尿病、电解质/酸碱平衡紊乱等）会直接影响发育中的机体，而毒物对这些母体因素的诱导或恶化以及它们引起异常发育的程度取决于母体的遗传背景、年龄、营养、疾病、其他暴露等。图 7-4 显示了它们之间的关系。发育毒物可经一种或多种途径引起发育异常。由该过程产生的孕体不利影响称为母源性发育毒性（maternal developmental toxicity）。

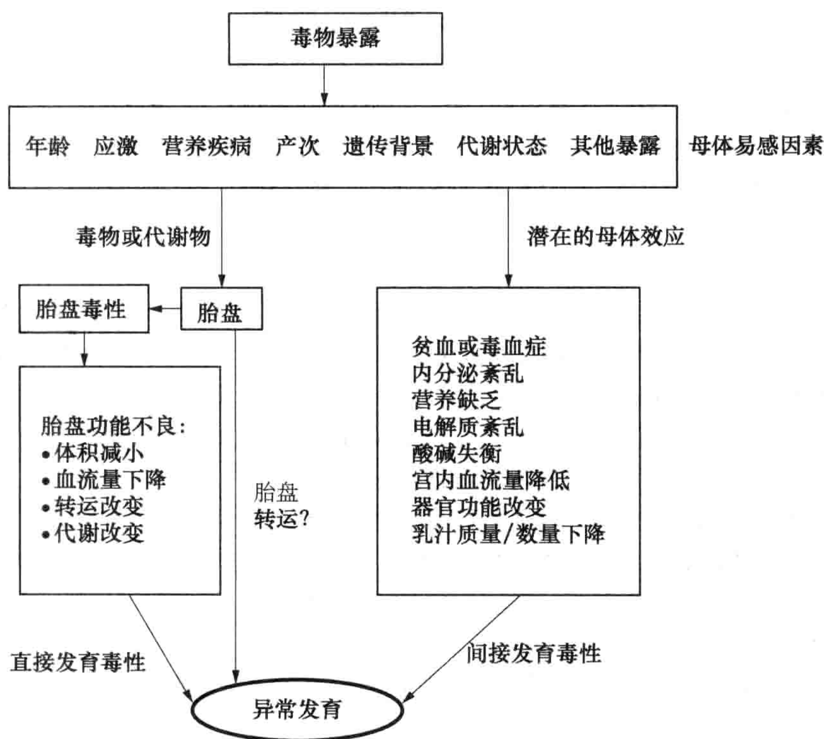


图 7-4 母体易感因子、代谢、母体生理或功能变化的诱导、胎盘转运和毒性与发育毒性的相互关系

1. 影响发育的母体因素

（1）遗传：已知孕母的遗传结构是孕体发育结果的一个决定因素，如唇腭裂的发病率依赖于母体的而非胚胎的基因型，白人中的发病率比黑人中更高。在两个相关的小鼠品系 A/J 系和 CL/Fr 系中，自发腭裂率分别为 8%～10%和 18%～26%。

（2）疾病：母体未控制的糖尿病、某些母体的感染和经过间接的疾病相关的母体变化或直接经胎盘的感染对孕体有不利的影响，如巨细胞病毒感染与胎儿死亡、小头畸形、心智发育延滞、盲目和耳聋有关联。过高热是实验动物的强致畸因子，在人类妊娠最初三个月内母体发热

与中枢神经系统畸形有关。

(3) 营养：蛋白质、热量、维生素、微量元素及辅酶因子的缺乏对妊娠有不利的影响。美国医学研究会(MRC)的研究发现，有生育神经管缺陷(NTD)婴儿危险的妊娠妇女，补充 4 mg 叶酸可减少 NTD 复发超过 70%。

(4) 应激：不同形式的母体毒性可能通过诱导生理学的应激反应产生发育毒性，如妊娠大鼠和小鼠对贯穿妊娠期的噪声应激可产生发育毒性。

2. *胎盘毒性* 胎盘是母体和孕体进行物质交换的器官，提供营养、气体交换和废物移出。胎盘是维持妊娠的关键因素，而且能代谢和(或)储存外源化学物。胎盘毒性物质能直接造成胎盘功能受损，并进一步对胎体产生间接影响。如 5-羟色胺使小鼠动、静脉狭窄，胎盘血流量减少及其转运功能障碍，导致死胎、畸形。甲基汞改变人胎盘滋养层微绒毛对不能代谢的氨基酸摄取，引起功能障碍，出现先天性水俣病，患儿严重神经迟钝，共济失调，步行困难，语言障碍，咀嚼及下咽困难，可伴有大发作性癫痫。某些化学物可经母血-胎盘进入胎儿，引发后代肿瘤。第一个人类经胎盘致癌物是己烯雌酚，孕妇在早期作为保胎药服用时，女性后代可发生阴道透明细胞腺癌、阴道腺癌、阴道和子宫隆起，男性后代可出现附睾囊肿、睾丸营养性衰竭、睾丸囊性硬结、小阴茎畸形及精子异常。

3. *母体毒性* 母体毒性(maternal toxicity)是指外源化学物在一定剂量下，对受孕母体产生的损伤作用，表现为增重减慢、功能异常、临床症状，甚至死亡。目前常用增重减慢和死亡率来表示。

外源化学物的母体毒性与发育毒性的关系如下。

(1) 母体毒性和致畸作用在一定暴露水平下都不出现。原因是受试物无致畸作用，也没有母体毒性，或者是动物暴露的剂量未达到致畸阈剂量(致畸作用的最小有作用剂量)。如果对一种外源化学物的致畸实验未观察到致畸作用，也无母体毒性表现，应在动物可能耐受条件下，最大限度地增加剂量，使其远远高于人类可能接触的水平，如仍未出现致畸作用，才可做出结论。一般母体毒性致畸作用剂量比母体毒性剂量小。

(2) 母体毒性和胚胎毒性同时出现。该受试物可能对胚胎有特定致畸机制，也对母体有损害作用。其原因可能是母体正常生理稳态受损，对胚胎也有非特异影响，引起畸形。如乙醇和可卡因主要在母体毒性水平对胚胎/胎仔产生有害影响。

(3) 有母体毒性，无致畸作用。多见于妊娠期。

(4) 无母体毒性，有致畸作用。提示该外源化学物有特定的致畸作用机制，与母体毒性无关，如沙利度胺致畸作用较强。

4. *父源性发育毒性* 人类发育包括两性配子的发生、出生后直至性成熟，在这期间暴露于有害因素都有可能产生发育障碍。精子被喻为“生命的种子”，劣质的精子与卵子结合后可以引起子代发育异常包括流产、死胎、低出生体重、畸形、功能障碍，甚至与儿童期肿瘤有关。有烟酒嗜好，职业性接触铅、镉、二溴丙烷等化学物的男工，容易出现少精、无精和生殖细胞发育不全、其妻子流产、死产的发生率增加。

越来越多的流行病学调查也显示，某些出生缺陷与父亲的遗传、年龄和暴露因素等有关，被称作为父源性出生缺陷(paternal birth defect)。有出生缺陷的父亲及其子代患出生缺陷的概率是正常对照组的 2 倍，比母亲有出生缺陷的后代高，其患有与父亲相同缺陷的危险性是正常人群的 7 倍。与 25～29 岁父亲的后代相比，20～24 岁父亲的后代腹裂畸形现患比(prevalence ratio, PR)为 1.47，大于 40 岁父亲的后代患 13 号染色体三体综合征的 PR 为 0.40。

第二节　生殖毒性与发育毒性机制

发育毒物引起发育毒性的机制十分复杂，多数还不清楚。严格来说，到目前为止还没有一个发育毒物毒作用的分子机制是完全清楚的，其主要原因是哺乳动物正常发育的分子机制尚不清楚。Wilson 在 1977 年最早提出了畸形发生的 9 种机制，包括突变、染色体断裂、有丝分裂改变、改变核酸完整性或功能、减少前体或底物的补给、减少能量支持、改变膜特性、渗透压不平衡和酶抑制作用。这些损伤并非特异性地针对发育，但可能更容易在胚胎中引起独特的病理反应。虽然胚胎有代偿机制弥补外源性化学物的影响，但是，是否产生畸形依赖于在致病过程中的每个步骤在损伤和修复之间的平衡。近年来，随着现代细胞分子生物学和分子胚胎学的发展，对发育毒物作用机制的认识也不断得到深化。

一、基因突变与染色体畸变

突变能诱发畸形，认为大多数诱变剂可致畸（以及发育毒性的其他表现），但致畸物不一定是诱变剂。有必要强调的是，只有诱发生殖细胞突变所致畸形才能遗传，对体细胞诱发突变所致畸形不能遗传，这是遗传毒理学的基本原理。对生殖细胞诱发染色体断裂和非整倍体，大多数在受精后导致着床前死亡（着床数减少）和吸收胎增多。

环磷酰胺（cyclophosphamide，CP）是一种烷化剂，也是典型的发育毒物，常作为动物致畸试验的阳性对照，其致畸作用机制研究得比较充分。妊娠第 13 天的大鼠胚胎羊膜内注入 CP 及其两个具有致畸活性的代谢产物丙烯醛（acrolein，AC）或磷酰胺氮芥（phosphoamide，PM）后，CP 和 AC 引起脑积水、露眼、腭裂、小颌畸形、脐疝、尾部和肢体缺陷；而 PM 仅仅引起脑积水、尾部和肢体缺陷。^{3}H 标记 CP 的实验显示，大约 87% 的放射性与蛋白质结合，5% 与 DNA 结合，8% 与 RNA 结合。使用碱洗脱，证实 CP 和 PM 引起单链 DNA 断裂以及 DNA－DNA 和 DNA－蛋白质交联。进一步的实验证明，AC 易与蛋白质结合，而 PM 易与 DNA 结合。PM 和 AC 对培养中的肢芽有明显的不同效应。这些结果提示 PM 和 AC 在胚胎中有不同的靶，PM 主要诱导 DNA 损伤，而 AC 可能通过与蛋白质结合而致畸。

有报道染色体畸变占人类发育缺陷原因的 3% 左右。这数字可能比实际低得多，因为常染色体数目改变常导致孕体死亡，其中着床前丢失难以发现，自然流产的胚胎中至少 50% 存在染色体畸变。两性生殖细胞各种染色体结构和数目异常引起的流产、死胎、畸形、智力低下或功能缺陷已为人们所知。

二、干扰基因表达

胚胎发育过程受到各种基因在时间、空间上高度有序表达的调控。发育的不同时期，基因表达的调控可能发生在不同水平（转录、转录后加工、翻译），以各种不同的机制进行。其中一些机制与遗传物质本身的改变（基因的缺失、放大、移位重组、修饰以及染色体构造变化等）有关，另一些则没有这些改变，而只涉及基因表达过程的不同环节（基因及其转录本 RNA 的选择和利用、mRNA 存活时间长短等）的调节。发育相关基因的表达受到干扰，也可以影响基因的功能，引起包括畸形在内的各种发育异常。如有报道在培养的小鼠胚胎中用反义寡核酸探针抑制原癌基因 *Wnt－1* 或 *Wnt－3a* 的表达，都可产生中脑、后脑和脊髓的畸形。反之，如向

小鼠胚胎中加入鸡的β-肌动蛋白启动子时，*Hox-1.1* 基因表达，并产生多种颅脸部和颈椎的畸形。

近年来大量研究表明，除了基因序列改变以外，非基因序列改变所致基因表达改变所致基因表达水平和基因功能的改变即表观遗传(epigenetic)改变，也可以影响胚胎的发育。目前已经明确的表观遗传学修饰过程包括 DNA 甲基化，组蛋白乙酰化、磷酸化、泛素化和泛素样修饰，以及染色质重塑等，其中对 DNA 甲基化的研究最为深入。孕鼠饲料中添加染料木黄酮等诱发 DNA 甲基化的化合物，可以改变子代的毛色。人工合成的已烯雌酚(DES)是典型的内分泌干扰物，可以引起人和啮齿动物生殖道发育异常和子代肿瘤易感性增加。

以往认为多数表观遗传学修饰在配子形成时和受精后，在每一新代中会消除。但 Skinner (2005)发现，这些表观遗传学改变可以在后代中持续存在。妊娠大鼠短期接触高水平的杀虫剂甲氧氯(methoxychlor)和杀菌剂乙烯菌核利(vinclozolin)，可以引起雄性子鼠精子生成减少和雄性不育，其作用机制之一是 DNA 甲基化，并发现在 F1～F4 代所有检查的后代中，有 90%存在不良影响。

三、细胞损伤与死亡

在胚胎发育过程中细胞增殖、分化和死亡都是必要的，它们之间存在精致的平衡，每种过程的抑制或促进都可能影响正常的发育。研究发现细胞死亡在正常的胚胎发育尤其在形态发生中扮演重要的角色，包括系统匹配(system matching)、躯体塑造(body sculpting)、残留结构去除(outlived structure removing)等。不同动物的不同组织在发育过程中都存在细胞死亡。

细胞死亡的研究近年来取得长足的进展，发现了多种程序性细胞死亡的方式，除了人们熟知的凋亡(apoptosis)，还有自噬(autophagy)、副凋亡(paraptosis)、胀亡(oncosis)、裂亡(mitotic cell death)或有丝分裂突变等。研究最多的是细胞凋亡，近年来自噬与发育关系的研究也逐渐增多，此外还有哺乳动物产后黄体细胞退化等，其他几种细胞死亡方式与胚胎发育的研究报道尚少。

高温、电离辐射、化学致畸物、病毒感染等可以通过不同机制影响细胞凋亡，干扰正常发育，引起胚胎畸形。典型的致畸物反应停就是一种强烈的致凋亡源，可以诱导胚胎细胞凋亡，并能通过抑制胰岛素样生长因子 1(IGF-1)及纤维母细胞生长因子(FGF)的基因复制而阻止其表达，从而抑制血管生成，导致胎儿畸形。全反式视黄酸(RA)的致畸作用也与凋亡有关，RA 可以通过 box 等一类凋亡基因编码的信号通路诱导胚胎细胞凋亡。小鼠胚胎暴露于致畸剂量的 RA，发现在出现畸形部位的细胞凋亡增加，RA 受体 β_2(RAR-β_2)转录上调。妊娠第 12 天的小鼠胚胎体外接触环磷酰胺，能增加肢顶尖外层嵴(AER)区域的细胞凋亡，可能与其诱导的短趾、少趾、无趾有关。甲基汞可以通过细胞凋亡引起胚胎脑部畸形。乙醇、生长激素等也可以通过促进细胞凋亡引起畸形。

四、干扰细胞-细胞交互作用

细胞-细胞间的相互作用主要通过细胞通讯来实现，包括缝隙连接(gap junction)通讯、膜表面分子接触通讯等直接的细胞间通讯和由受体介导的细胞信号传导系统。当一个细胞发出信号后可以通过缝隙连接直接到达相邻细胞，也可以与相邻细胞的膜表面蛋白、糖蛋白、糖脂等表面分子特异性识别、相互作用，还可以与另一细胞的跨膜受体蛋白结合，使后者的状态发生改变，并从其细胞内转录一个信号，启动信号通路。信号通路是细胞内的一些中间体，当第

一个中间体被信号激活后，可转而激活下一个中间体，而其自身恢复到非激活状态，如此逐一传递，形成信号通路。在通路的末端，所传递的信号使靶蛋白激活或抑制，从而调控基因转录表达、细胞增殖、分化、移动、存活等。因此，细胞通讯在胚胎发育尤其是组织器官发生过程中有十分重要的作用。

研究发现胚胎发育的各个阶段都有不同的细胞通讯方式存在。细胞通讯收到破坏就可以影响正常的细胞生物学过程，引起畸形或其发育毒性。小鼠早期胚胎在囊胚早期分化出滋养层和内细胞团，这一分化与细胞晚期细胞间形成的间隙连接有关。将大鼠肝细胞缝隙连接的纯化蛋白抗体注入细胞阶段的蟾蜍胚和单个细胞中，这些抗体在没有出现细胞毒性或抑制细胞分裂的水平下，就可以使细胞产生异常的形态，并在成熟蝌蚪中出现可重复的特征性畸形。

五、通过胎盘毒性引起发育毒性

已知对卵黄囊或绒(毛)膜尿囊胎盘有毒性的毒物至少有 46 种，包括镉(Cd)、砷、汞、香烟烟雾、乙醇、可卡因、内毒素和水杨酸钠等。如 Cd 在妊娠中晚期通过胎盘毒性(引起坏死和血流减少)和抑制对营养物质的传送导致发育毒性。

实验发现，在妊娠晚期大鼠体内注入 Cd 造成胎儿死亡，但几乎没有 Cd 进入胎儿体内，而是在 10 小时内伴随子宫胎盘血流减少发生胎儿死亡。如胎儿直接注射 Cd，尽管胎儿的 Cd 负荷比母体给药后高几乎 10 倍，胎儿死亡仅有轻微增加。此外，Cd 可在胎盘诱导金属硫蛋白(MT)，MT 对 Zn 有高亲和力，可在胎盘中结合 Zn 而干扰 Zn 转移通过胎盘。Cd 的理化性质与 Zn 相似，可竞争性抑制人类通过胎盘微泡吸收 Zn 跨膜转运，以及竞争性地在胎盘中抑制其他 Zn 依赖的过程。联合给予 Zn 可以改善 Cd 的发育毒性。

六、干扰母体稳态

某些化学物引起 C57B1/6J 小鼠出现母体毒性后，方才引起发育毒性，说明它们的发育毒性及致畸作用是通过干扰母体稳态而实现的。二氟苯水杨酸能引起兔的中轴骨骼缺陷，其发育毒性剂量引起严重的母体贫血并损耗红细胞的 ATP 水平。孕第 5 天给单剂量的二氟苯水杨酸引起母体贫血，持续到孕第 15 天，而这正是缺氧引起类似的中轴骨骼缺陷的关键日子，胚胎中血药浓度低于母体血药峰浓度的 5%。因此，二氟苯水杨酸对家兔的致畸性或许是由于母体贫血造成缺氧的结果。

苯妥英(二苯乙内酰脲)在实验动物中能影响母体的叶酸代谢而致畸。孕第 10 天，苯妥英能剂量依赖性地降低易感的 A/J 小鼠的心率，实验性给氧可减少苯妥英对小鼠的致畸性；而拮抗性的 C57B1/6J 小鼠心率不降低。因而，认为苯妥英诱导的畸形与母体心率降低和胚胎缺氧有关。

减少子宫的血流被认为是羟基脲引起致畸的一种机制，它提高收缩压，改变心率，减少心输出，严重地减少子宫的血流，而且在妊娠家兔中增加血管的阻力，给药后胚胎立即显示颅面和心包出血。通过夹紧妊娠家兔子宫血管 10 分钟可引起同样的胚胎异常。

七、内分泌干扰化学物的发育毒性

“内分泌干扰物”已经广义地被定义为“干扰稳态维持和发育过程的天然激素的产生、分泌、转运、代谢、结合、作用或消除的外源性物质”。由于激素在很多组织中有引导分化的关键

性作用，发育中的机体对有激素（或抗激素）活性的化学物接触时间和强度上的波动特别敏感。许多类型的化学物如杀虫药、除草剂、杀菌剂、增塑剂、表面活性剂、有机金属、卤代多环芳烃化合物、植物雌激素至少通过 4 种涉及内分泌系统的作用模式来诱发发育毒性：①通过作为甾体类激素受体的配体起作用；②修饰类固醇激素代谢酶类；③干扰下丘脑-垂体促激素的释放；④通过到目前为止还不清楚的近似激素的模式作用。

第三节　生殖毒性与发育毒性评价

来自生殖、发育毒性的化学物的经验教训表明，动物实验和人群流行病学监测对提供充分的公共卫生保护是必需的。

一、生殖毒性及其评价

外源化学物生殖毒性的评价方法包括：①人群流行病学调查；②动物整体生殖毒性实验；③体外实验，对受试外源化学物影响亲代生殖系统和子代的安全性进行评估。新化学物生殖毒性的评价则主要通过动物整体生殖毒性实验。

（一）人群流行病学调查

利用流行病学调查方法，研究外源化学物接触人群，可获得有关人群接触外源化学物的生殖毒性资料。生殖流行病学研究是父体和母体、孕体特定的暴露与生育结局之间统计学关联的科学。由于动物生殖毒性实验结果在外推到人时涉及诸多不确定因素，生殖流行病学调查对于评价外源化学物生殖毒性更为可信。

1. 评价化学物对男性生殖功能影响　男性生殖功能受影响的人群流行病学调查，一般可通过精液调查、男工妻子生育史及其子代发育情况进行评价。

2. 评价化学物对女性生殖功能影响　女性生殖功能影响的人群流行病学调查常用指标有：①月经情况。主要调查月经周期、经期、月经量的改变以及并发症，如痛经、经前紧张等情况。②妊娠结局。主要调查不孕、先兆流产、死胎（产）、早产及妊娠恶阻、妊娠高血压综合征、贫血。③子代发育影响。主要调查流产、先天缺陷、低出生体重儿、围生期死亡、性别比等情况。

（二）生殖毒性实验

生殖毒性实验旨在揭示外源化学物对哺乳动物生殖的有害影响，并结合其他资料推测其对人体可能造成的生殖危险。生殖毒性实验可以全面反映外源化学物对性腺功能、发情周期、交配行为、受孕、妊娠过程、分娩、授乳以及幼仔断乳后生长发育可能产生的影响。评价的主要依据是交配后母体受孕情况（受孕率）、妊娠过程情况（正常妊娠率）、子代动物分娩出生情况（出生存活率）、授乳哺育（哺育成活率）以及断乳后发育情况等。

1. 生殖毒性实验

（1）致畸实验：妊娠后一定时期给予受试物，以检查出生前胎仔发育情况为重点，主要观察化学物质是否有使胎仔出现形态、功能异常的作用。行为致畸实验指出生后仔代发育包括体格、行为发育的观察。

（2）一代生殖实验：检查受试物能否对配子发生和形成产生影响的生殖实验，其旨在观受

试物能否影响动物的发育成长、性功能、妊娠、分娩和授乳能力等。

(3) 多代生殖(繁殖)实验:对子代进行多代的观察。

生殖毒性实验根据化学物质与人的接触方式、阐明问题的主要目的采用不同的实验方式来进行。药物的生殖发育毒性评价主要用三段生殖毒性实验,由药品登记技术要求国际协调会议(ICH)、美国食品药品监督管理局(FDA)、中国食品与药品管理局(SFDA)等组织规定使用。一些外源化学物如食品添加剂、农药以及环境污染物等人类长期连续反复接触,与仅在患病期间使用的药品不同。因此,查明这些化合物对生殖有关的影响,仅做三段生殖毒性实验是不够的,还应进行多代生殖(繁殖)实验。

生殖毒性实验研究应包括成年动物和从受孕到子代性成熟的各个发育阶段接触受试物。为检测接触所致的即发和迟发效应,应通过一个完整的生命周期,即从亲代受孕到子一代受孕。生殖发育过程的不同阶段(A～F 阶段)的组合可以构成许多可能的测试方案,各个国家和国际机构均发布了不同的实验准则和研究设计细则。本节介绍 ICH 准则和我国新药评价、农药及健康相关产品安全性评价中推荐的三段生殖毒性试验,一代和多代生殖(繁殖)毒性实验。

2. 生殖毒性实验方法原则

(1) 动物选择:必须以哺乳动物为实验对象。原则上实验动物对受试物的动力学、毒效学及其他有关参数应与人最接近,如代谢过程与生物转化方式应与人体相近、胎盘结构与人体相似、健康、生育力强、多产、孕期短、自发畸形率低、价廉、易得和操作方便。首选啮齿类的大鼠。在胚体-胎体毒性研究中,传统上要求用第二种哺乳动物进行实验。家兔因其也有较广泛的背景资料和比大鼠更接近人体的代谢类型而作为"非啮齿类"优先使用。

(2) 分组与剂量选择:一般设 3 个剂量组和适当的对照组。最高剂量组剂量应该超过预期人类实际接触水平,应该使亲代动物产生轻度中毒(如进食量显著减少,体重明显下降),但不出现死亡或死亡率不超过 10%,也不应完全丧失生育能力。低剂量组亲代动物不应观察到任何中毒症状,中间剂量组仅出现极为轻微的中毒症状。剂量选择应根据急性、慢性毒性以及动力学研究得到的资料。最高剂量也可以是略高于亚慢性毒性实验中最大无作用剂量,或相当于 LD_{50} 的 1/10;最低剂量可相当于最高剂量的 1/30,中剂量组应在高、低剂量之间按等比级数定位。

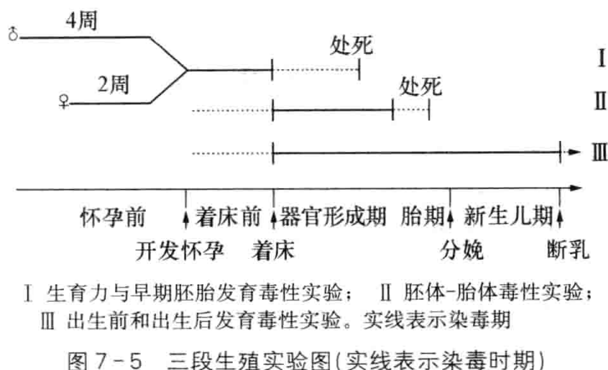
(3) 接触途径与频率:参照人类实际的接触途径,如果采用其他接触途径,必须依据动力学的资料。接触频率一般是每日 1 次,每日在相同时间染毒,按体重调整染毒剂量。

(三) 三段生殖毒性实验

三段生殖毒性实验(three segment reproduction toxicity test)包括生育力和早期胚胎发育毒性实验、胚体-胎体毒性实验(致畸实验)和出生前后发育毒性实验(围生期毒性实验)组成(图 7-5)。三段的划分是按有害作用诱发的时期来确定。3 个有关联的阶段接触受试物时期至少有一天重叠,能直接或间接地评价生殖全过程。生育力和早期胚胎发育毒性实验,在交配前和妊娠前期给药,主要检查受试物对受胎能力、生殖系统有无不良的影响。胚体-胎体毒性实验,是检查受检物是否有胚胎毒性或致畸性。出生前后发育毒性实验是检查围生期及授乳期给予受检物是否对胎仔出生后引起发育障碍。

1. 生育力和早期胚胎发育毒性实验

(1) 研究目的:评价化学物对配子发生和成熟、交配行为、生育力、胚体着床前和着床的影响(包括生殖发育过程 A 和 B 阶段的评价)。此外,雌性包括对动情期、输卵管运输、着床和胚



Ⅰ 生育力与早期胚胎发育毒性实验； Ⅱ 胚体-胎体毒性实验；
Ⅲ 出生前和出生后发育毒性实验。实线表示染毒期

图7-5 三段生殖实验图(实线表示染毒时期)

体着床前阶段发育的影响，雄性包括对功能的影响(如性欲、附睾精子成熟等)。

(2) 实验动物：至少一种，首选大鼠，每组每性别16～20只(窝)。

(3) 给药时间：应说明交配前染毒时间，一般采取雄性交配前4周开始染毒，直至交配成功。若要保证雌性受孕成功，雄性也可继续染毒，同笼至处死。雌性交配前2周开始染毒(至少2个完整的动情期)至着床。

(4) 交配及受孕检查：雄性大鼠给药4周，雌性大鼠给药2周后开始同笼。交配期2～3周，交配比例1∶1。实验程序应能识别出各窝的2个亲本，以避免不正确结果的分析和解释。

(5) 终末处死：雄性在交配受孕成功后处死检查。雌性在孕第13～15天终止妊娠。

(6) 观察项目：染毒期间观察雌、雄亲代(F_0)体征和死亡(至少1次/天)，体重和体重改变(至少2次/周)，摄食量(1次/周)，镜检雌性阴道涂片(交配期间1次/天)和其他毒性研究中见到的靶效应。

处死时，尸体解剖和肉眼观察所有动物，包括睾丸、附睾、卵巢和子宫的组织学检查，附睾或睾丸精子计数、精子存活力测定。检测雌性的黄体数、着床数、吸收胎、死胎和活胎数。留存肉眼有改变的脏器，以便进行可能的组织学评价，留存足够对照组的相应脏器，以供比较。

(7) 结果评定：综合对F_0代观察的各项指标和参数，用合适的统计方法分析和评价。在分析对胎体(子一代，F_1)的影响时，应考虑下述参数：各组受影响的窝数比；每窝受影响的胎体平均百分率；受影响胎体总数比。

2. 胚体-胎体毒性实验(致畸实验) 见本节第二部分发育毒性及其评价。

3. 出生前和出生后发育毒性实验(围生期毒性实验)

(1) 研究目的：评价母体从着床至断乳期间接触化学物对妊娠或哺乳母体、孕体及子代发育直至性成熟的影响(C～F阶段)。在这期间引起的毒性反应会推迟发生，故观察应继续到性成熟。

(2) 动物：至少一种，首选大鼠，每组16～20窝。

(3) 给药时间：雌性从着床至哺乳期结束，大鼠为孕15天至产后28天。

(4) 实验程序及终末处死：允许分娩和抚养子代到断乳。子代出生当天为出生后0天。在子代断乳时，每窝选出部分雄性和雌性子代抚育至成熟、交配。有些实验室将亲代(F_0)动物分组，分别或联合进行行为实验和生殖功能评价。

亲代于F_1代断乳时处死。F_1代动物处死日龄以及窝大小因实验室而异，尚未统一。有些

实验室在 F_1 代出生 0、3 或 4 天调整窝大小，每窝 8 只，尽可能雌雄各半，并在出生第 21 天或断乳时陆续处死。评价生殖能力的 F_1 代雄/雌同笼，至子二代(F_2)出生时后处死。

(5) 观察项目：染毒期间观察亲代(F_0)体征和死亡(至少 1 次/天)、体重、体重增长(至少 2 次/周)和在前述有评价价值的靶效应、妊娠的时间、分娩情况。

处死时对所有亲代和 F_1 代成体进行尸解，肉眼检查任何存在的结构异常或病理改变，尤其注意生殖器官，留存有变化的脏器，进行组织学评价。留存足够对照组相应脏器供比较。检查着床数，对明显未孕大、小鼠可用硫化铵染色，以证实胚胎着床前已死亡。

子代需检查每窝出生时活仔数、死仔数、畸形数、出生时和断乳前后存活率、体重、身长、身体发育、性成熟和生育力、感觉功能、反射和行为等。断乳前还包括张耳、开眼、出毛、出牙。断乳后包括雌性阴道张开和雄性龟头包皮分开。功能实验主要有感觉功能、反射、运动能力、学习和记忆的检测。

(6) 结果评定：综合亲代(F_0)和子代(F_1)各项观察指标结果，对围生期给药的毒性及影响程度作出综合评价。

(四) 一代和多代生殖(繁殖)实验

生殖毒性是最复杂毒性表现之一，除有母体受孕、妊娠哺乳及幼仔形态结构异常外，还可出现行为、生理状况异常，且出现时间也不一。一代生殖(繁殖)实验(single-generation reproduction test)是将实验动物在出生或断乳时处理，仅对一个生殖周期进行观察。多代生殖(繁殖)实验(multi-generation reproduction test)可弥补一代生殖实验的不足(未能观察生殖毒性在子代的表现)。同时，在整个生命期内接触受试物，更符合人类长期低剂量接触的情况。多代生殖(繁殖)试验一般只观察两代或三代，观察指标同一代繁殖实验。一、二或三代研究的定义是按直接与受试物接触的成年动物的代数确定的。两个实验区别在于给予受试物时间和观察时间的不同，应根据实验目的、经费及条件选择。除了家兔胚体，胎体发育试验外，上述各段实验都可合成一代或多代研究以代替分开进行的每段实验。

1. 一代生殖毒性实验　美国 FDA 的两窝生殖实验以及三段生殖实验中的第一段实验属于一代生殖实验，其主要目的在于检查受检物对受胎能力、胚胎及胎仔的发育或死亡、新生仔的发育、畸形发生以及乳汁分泌等方面的影响。从一代生殖实验仅能获得有关受检物质对性腺功能、动情周期、交尾、受胎能力、分娩、授乳以及对新生仔死亡率及畸形发生上的影响等方面的资料，为进一步深入实验做参考，但不能明确阐明发生影响的特定时期和原因。

一代生殖毒性实验是指亲代(F_0 代)动物直接接触受试物，子一代(F_1)在宫内及经哺乳接触受试物，主要评价受试物对亲代青春期前后和成年动物亚慢性暴露的影响。如生育力研究和出生前后研究的染毒期合并，雄性在交配前 4 周，雌性在交配前 15 天直至断乳接触受试物，构成典型的一代生殖毒性研究(即 A～E 阶段的评价)(图 7-6)。假如该研究包括胚体-胎体期检查，部分孕鼠在分娩前一天处死，检查胎鼠形态与结构，另一部分正常分娩和继续接触受试物至断乳和对子代进行生化、生理或行为的评价。

2. 两代(多代)生殖毒性实验

与一代生殖实验相似，从配子形成受影响致后代发育可能发生障碍的观点出发，进行传代实验以检测受试物对多代的综合影响。亲代从交配前开始给予受试物，子代自断乳后开始给予受试物，60～100 天后交配，再继续给予受试物，直至获得预期的子代为止。根据实验目的，可进行两代、三代或更多代的繁殖实验。



图 7-6　一代生殖毒性实验图

两代生殖(繁殖)毒性实验是指对两代动物染毒，即 F_0 代直接接触受试物，F_1 代有直接接触，也有经母体间接接触，子二代(F_2)在宫内和哺乳期接触受试物。三代及多代的研究也依此类推。

实验程序：F_0 代雄性于交配前 4 周接触受试物，雌性于交配前 2 周接触受试物并延续至哺乳期，以便 F_1A 代经胎盘转运和经乳汁接触受试物。F_1A 代在断乳时处死，尸体解剖检查出现异常、畸形。断乳第 2 周，仍然接触受试物的 F_0 代雌鼠再繁殖产生第 2 窝 F_1B 代。F_1B 代断乳后，随机选出部分 F_1B 进行进一步的生殖毒性研究。即 F_1B 代在同一周龄接受同一剂量受试物，繁殖并开始下一个周期，产生 F_2A 代。F_2A 代断乳时处死、检查。F_1B 代再繁殖，产生第二窝 F_2B 代。如此提供了不断接触受试物的子代来源和开始下一代 F_3A 和 F_3B。图 7-7 表示三代生殖试验。

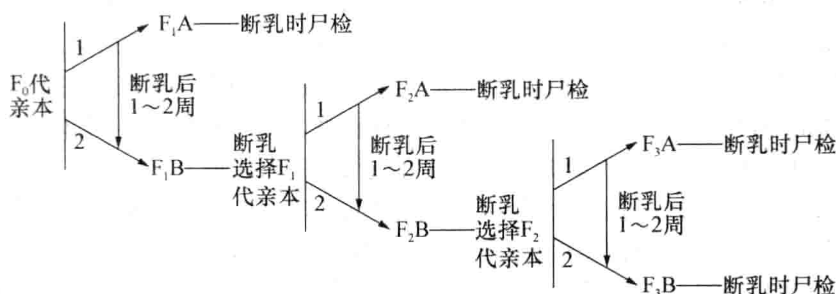


图 7-7　多代(三代)生殖毒性实验图

结果评定：应依据观察到的毒效应、尸检和镜检结果对生殖毒性研究的发现进行评价。评价包括受试物剂量与生育力、体征、体重改变、死亡数及其他毒效应在内的异常是否存在及其严重性的关系。生殖毒性试验应提供 NOAEL 的良好估计和对生殖、分娩、哺乳和出生后生长等的了解。生殖毒性试验中的主要观察指标见表 7-2。

表 7-2　一代或多代生殖(繁殖)实验的受孕和生殖评价指标

评价指标	公式	评价指标	公式
交配指数(%)	$\frac{\text{阴道检出精子的雌鼠数}}{\text{用于交配的雌鼠数}}\times 100$	活产率(%)	$\frac{\text{出生时活产的胎仔数}}{\text{胎仔的总数}}\times 100$
受精指数(%)	$\frac{\text{与雄性交配受精的雌鼠数}}{\text{与雄鼠同笼的雌鼠数}}\times 100$	妊娠率(%)	$\frac{\text{妊娠出生活胎的鼠数}}{\text{受孕的鼠数}}\times 100$

（续表）

评价指标	公式	评价指标	公式
受孕率(%)	$\frac{\text{妊娠的雌鼠数}}{\text{交配的雌鼠数}} \times 100$	存活率(%)	$\frac{\text{出生第一天存活的鼠数}}{\text{胎仔总数}} \times 100$
正常分娩率(%)	$\frac{\text{正常分娩雌鼠数}}{\text{妊娠的雌鼠数}} \times 100$		

多代生殖毒性实验的主要优点是能检测对生殖直接或间接的毒作用。交配前观察为支配后检测评价提供背景资料，交配早期的观察可确定性欲缺乏或激素(动情)周期紊乱，此后的资料表明繁殖力、生育力、出生前的毒性、分娩、哺乳、断乳和子代出生后的生长和发育、青春期至性成熟的毒效应。

在生殖毒性实验中，可能需要交叉交配(即未处理的雄性与处理的雌性交配，或反之)，以查明不育配偶的性别。一旦确定不育性别后，生殖系统的组织病理学检查可以提供表明毒效应种类的报告。

出生后仔鼠的生长速度和存活率受多种因素的影响，包括母体饲养、宫内开始的效应、母体哺乳减少、乳汁中毒物。当出现仔鼠死亡或体重增长降低时，首先应对死亡仔鼠进行组织病理学检查。如果哺乳受到影响，应进行交叉抚养研究，即处理母鼠的仔鼠由未处理的母鼠抚养，或反之。

(五) 生殖毒性的检测

1. *雄性生殖毒性的检测* 许多试验可用于评价雄性生殖毒性，多个细胞位点或生殖过程对于外源化学物和药物的作用很敏感。一般检测雄性生殖毒性可能需要连续反复多次暴露。大多数试验一般限于动物而不适用于人类，且有损伤性。雄性生殖毒性的检测方法见表7-3。

表7-3 雄性生殖毒性检测方法

睾丸	精液
原位大小	总体积
重量	无凝胶体积
精子细胞储量	精子浓度
大体与组织学评价	精子总数/射精
非功能性精小管(%)	精子总数/禁欲日
具有精子的生精小管(%)	肉眼观察精子活率(%)
生精小管直径	录像磁带上精子活率(%)和速率
细线期精母细胞计数	大体精子形态学
附睾	详细精子形态学
重量级组织学	内分泌
附睾体精子数	黄体生成素
附睾尾精子活力(%)	卵泡刺激素
附睾尾大体精子形态学(%)	睾酮
附睾尾详细精子形态学(%)	促性腺激素释放激素
生化分析	生育率
附属性腺	暴露率:妊娠率
组织学	每个孕妇(或怀孕动物)的胚胎数或产仔数
比重测定(重量分析)	胚胎成活率:黄体数

（续表）

2～8 细胞卵	精子活率
每卵精子数	时间-暴露照相术
体外试验	多重-暴露照相术
介质中精子孵育	显微电视照相术
仓鼠卵穿透试验	精子膜特征
需要考虑的其他试验	精子代谢评价
睾丸密度张力测量	精子中荧光 Y 小体
睾丸定性组织学	流式细胞术检测精子
睾丸定量组织学	人精子原核核型
精子释放循环周期	宫颈黏液穿透试验

2. 雌性生殖毒性的检测　对雌性哺乳动物生殖过程的评价比雄性动物要复杂，许多实验也可用于评价雌性生殖毒性，其检测方法见表 7－4。

表 7－4　雌性生殖毒性检测方法与内容

体重	输卵管
卵巢	组织学
脏器重量	配子转运
组织学	受精
卵母细胞数	早期胚胎转运
卵泡闭锁率	子宫
卵泡类固醇生成	细胞学和组织学
卵泡成熟	宫腔液分析
卵母细胞成熟	（外源化学物，蛋白质）
排卵	脱膜反应
黄体功能	功能障碍性出血
下丘脑	子宫颈/外阴/阴道
组织学	细胞学
神经递质，神经调节剂和神经激素合成与释放的改变	组织学
	黏液生成量
垂体	黏液质量（精子穿透实验）
组织学	生育率
营养激素合成与释放的改变	暴露率：妊娠率
内分泌	每个孕妇（或怀孕动物）的胚胎数或产仔数
促性腺激素	胚胎成活率：黄体数
绒毛膜促性腺激素水平	着床率：黄体数
雌激素和黄体酮	2～8 细胞卵
	体外实验
	应用超排卵的卵子与化学物共培养或处理组雌性动物卵子进行体外受精

二、发育毒性及其评价

外源化学物发育毒性的安全评价包括动物实验和人群监测。此外，化学物的结构和理化性质也是评价其安全性的基础资料。

（一）体内动物实验（致畸实验）

1. 实验方案　最常用实验动物评估发育毒性的方法是器官形成期的妊娠动物（大鼠、小

鼠或家兔)暴露于受试物,然后观察整个妊娠期母体的反应、妊娠末期母体和子宫的各种变化、子代特定器官和系统发生的畸变等,即传统致畸试验。此外,发育毒性还可以评价受精之前的父母一方或双方暴露、妊娠期间的孕体暴露、跨代暴露、产前和断乳前的胎儿暴露的影响。

(1) 动物选择:实验动物除满足一般原则外,选择妊娠过程较短、每窝产仔数较多和胎盘构造及厚度与人类接近的动物。一般首选大鼠,其次是小鼠或家兔。

大鼠对一般外源化学物代谢速度往往比小鼠和家兔快,因此对化学致畸物耐受性强、易感性低,有时有假阴性。在器官发生期初期,大鼠胎盘有卵黄囊,称为卵黄囊胎盘,在器官发生期后期,转变为绒膜尿囊胎盘。如锥虫蓝可以干扰经卵黄囊胎盘对胚胎的正常营养过程,故致畸产生阳性结果。人类胎盘没有卵黄囊胎盘阶段,不存在上述问题,所以有时该结果对人类为假阳性。小鼠自然畸形发生率比大鼠高,比家兔低,对形成腭裂的致畸物更为敏感。家兔是草食动物,与人类代谢功能差异较大,妊娠期不够恒定,有时延长至 36 天,自然畸形发生率也较高。

(2) 剂量分组:由于致畸作用剂量-效应(反应)关系曲线较为陡峭,斜率较大,NOAEL 与引起胚胎大量死亡、母体中毒死亡的剂量很接近。因此,在确定剂量时,首先要找出 NOAEL 以及致畸阈剂量,其次要保持母体生育能力,不致大批流产和过多胚胎死亡,再次应避免较多母体死亡。一般预试找出引起母体中毒的剂量,然后根据预试结果确定正式实验剂量。正式实验最少设 3 个剂量组,1 个溶剂对照组,必要时设阳性对照组。原则上最高剂量组,可以引起母体轻度中毒,即进食量减少、体重减轻、死亡不超过 10%。最低剂量组不应观察到任何中毒症状;中间剂量组允许母体有某些极轻微中毒症状。一般受试物最高剂量不超过 LD_{50} 的 1/5~1/3,低剂量是 LD_{50} 的 1/100~1/30,中间组剂量与高、低剂量呈等比级数关系。每组受孕雌性动物数量为:大鼠或小鼠 15~20 只,家兔 10~12 只。阳性对照组大鼠或小鼠可给予维生素 A、阿司匹林、敌枯双、五氯酚钠等,家兔可用 6-氨基烟酰胺。

(3) 动物交配处理:性成熟雌雄动物按雌雄 1∶1 或 2∶1 比例同笼交配。每日将已确定受孕雌鼠随机分入各剂量组和对照组。确定交配方法是阴栓检查或阴道涂片精子检查。

大鼠和小鼠一般可自孕第 6 天开始给予受试物,每日一次,持续到孕第 15 天;兔持续到孕第 6~18 天。

受试物给予方式应与人体实际接触情况一致,通常经口给予。实验期每 2~3 天称取母鼠体重,据体重变化调整受试物剂量,并可判断胚胎发育情况。

2. 观察指标　自然分娩前 1~2 日将受孕动物处死,剖腹取出子宫及活产胎体,并记录死胎、吸收胎。小、大鼠、家兔分别在孕后第 18、20、29 天处死,取胎检查。

剖腹取出子宫体,称量胎盘,记录并检查吸收胎、早死胎、晚死胎及活胎数。大鼠和家兔还应取出卵巢,记录黄体数代表排卵数。活产胎取出后进行以下畸形检查。

(1) 肉眼检查外观畸形:记录胎鼠性别、体重、体长、尾长,检查其外观有无异常,主要有头部、四肢、躯干畸形,尾畸形,肛门畸形,双胎畸形及其他全身情况(如有无水肿、血肿、出血、肿块等)。

(2) 取一半活胎体经 Bouin 液固定,肉眼检查内脏及软组织畸形。

(3) 取一半活胎体经茜素红染液染色,作软骨和骨检查,主要包括头部骨骼、颈椎骨、胸腰椎骨和尾椎骨、胸骨骨化中心、肋骨、四肢骨等。

3. 结果评价　母体终点评价指标有体重及其变化、食物消耗量、母体毒性体征及其畸胎出现率。胎体评价包括受影响的窝比数、每窝受影响胎体数的组间均数、受影响的胎体总比数、畸胎率和某单项畸胎率等。在致畸实验结果评定时,应以窝(或孕鼠)为实验单位,主要计

算母体畸胎出现率。按下列指标将各剂量组与对照组结果进行比较，并分析其剂量-效应（反应）关系。

(1) 母体畸胎出现率：出现畸形胎体母体在妊娠母体总数中占的百分率。

$$母体畸胎出现率(\%) = \frac{发现畸胎的母体数}{妊娠母体数} \times 100\%$$

(2) 活产幼仔平均畸形出现数：根据出现的畸形总数，计算每个活产幼仔出现的畸形平均数。对较为重要的畸形，还可分别单独进行计算。

(3) 畸胎出现率：即出现畸胎的幼仔在活产幼仔总数中所占的百分率。

(二) 发育毒性替代实验

替代实验的目的是使用更加优化、更少数量或是替换一些标准哺乳动物实验的方法来评价受试物的发育毒性，主要包括细胞培养实验、体外胚体培养实验和短期体内实验。然而，这些替代实验的证实尚未解决。由于缺乏公认的标准，评价这些实验结果的敏感性和特异性也存在一定问题。人们最初的想法是希望将替代实验普遍用于所有化学物，并逐级完成全部实验。事实上，考虑到胚胎发生的复杂性以及致畸物作用的多重机制和靶点，想通过单独一个实验或少数几个实验就准确地筛选出所有活性化学物的想法可能并不现实。

1. 体内初筛实验（C/K 实验） 1982 年，Chernoff 和 Kavlock 改进的发育毒性体内预筛实验称为 C/K 实验。1995 年列入 OECD（Organization for Economic Co-operation and Development）化学品测试准则，推荐用大鼠。其原理是大多数出生前的损害在出生后表现为存活力降和（或）生长障碍，故在仔鼠出生后，观察其外观畸形、胚胎死亡、生长迟缓等发育毒性表现，而不进行常规实验中内脏和骨骼检查，就可以达到初筛目的。该法用的动物数少，检测终点少，实验周期短，能提供有关化学物对生殖和（或）发育可能产生影响的初步信息，有效地用于初筛化学物。

2. 体外初筛实验 近年来，完成了大鼠胚体肢芽微团实验、大鼠全胚胎培养实验和小鼠胚胎干细胞实验等体外胚胎毒性实验的确证实验。与整体动物实验结合，它们可为相应的筛查或解释发生机制提供有价值的资料，并间接减少动物数量。

(1) 大鼠胚胎肢芽微团实验（embryonic limb bud cell micromass culture test）：从大鼠胚体分离中脑和肢芽细胞团培养 5 天，对细胞增殖和分化的生化标志物进行评价。

(2) 大鼠全胚胎培养实验（whole embryo culture test）：将植入后的胚体在体外旋转培养 2 天，培养液中含有受试物，以评价其对生长和发育的影响。以胚胎心跳和血液循环是否存在作为胚胎存活指标，以卵黄囊直径、颅臀长、头长、体节数和胚胎重作为生长发育指标；以 Brown 评分对器官形态分布进行评价。该实验可以筛查化学物的发育毒性，并探讨其剂量-反应关系和可能作用机制。

(3) 小鼠胚胎干细胞实验（the mouse embryonic stem cell test, EST）：将小鼠胚胎内细胞团衍生的胚胎干细胞（embryonic stem cell, ES）在特定条件下，定向分化为机体多种细胞（心肌细胞、内皮细胞、胰岛细胞、神经细胞等），接着以这些细胞系作为生物测试模型，用于评价哺乳动物细胞分化和组织形成过程的发育毒性机制。

(三) 人群研究

原则上，人的数据是发育毒性评价的首选。人群流行病学研究生殖结局异常的主要目的是：①通过个案报道或同类现象集中报道分析的信息，探讨出生缺陷的病因；②广泛地监测

世界各国的出生缺陷登记，了解出生缺陷发生趋势，寻找预防措施；③引起世人注意，保护公众健康。然而，获得人类数据很复杂，有很多潜在毒物的数据难以获得。

人群研究包括流行病学调查、个别案例和群体事件报告。流行病学调查的环境暴露水平测定对于估计暴露-反应关系占有最大的权重。个别案例或群体事件报告是在暴露写结局关系的假说基础上产生的，但是需要流行病学调查和实验室研究来进一步地证实。不过，一些极少见的暴露，如风疹、沙利度胺和异曲替酯等，其发育毒性较强，引起的结果十分罕见，一般不需要用流行病学研究来确定病因。通常情况下，出生缺陷越少见，暴露越少见，人群范围越小，发生周期越短，其生物学上联系越大，越容易明确特定暴露与不良妊娠结局之间的关系。在其他情况下，需要通过病例对照研究或队列研究来寻找因果关系。令人关注的是：①这两种方法都要十分肯定的结局和暴露，而且需要十分明显的毒性作用和足够大研究人群样本量才能得出相对可靠的结果。在美国，丙戊酸暴露率不到1‰，其导致脊柱裂畸形的危险度是对照组的2倍，如果想发现有统计学意义的丙戊酸暴露引起的畸形率上升至少需要监测一百万例分娩。②人群中妊娠失败率高。约有31%的妊娠失败发生在植入期前后，临床上可见的流产约15%。因此，一般人群中特定暴露导致的妊娠失败很多被忽略了。此外，随着产前检查的普及，很多人都选择性地及早将畸胎流产掉。由此可见，出生缺陷发病率一词可能不能真实反映孕体发育异常的比率。用“患病率”也许更好，因为其分母是出生活产数而不是妊娠数。③研究的同质性、记录的专业性以及对混杂因素的处理等。人类对遗传易感性与出生缺陷之间关系的了解随着人类基因组计划的完成不断加深，掌握环境因素诱导出生缺陷的遗传学基础能扩大危险度评价范围，从而更好地认识发育毒性物质的作用机制。

（四）发育毒物的确定和危险性评价

目前，约4 000多种化学物质经过动物致畸实验检测，其中至少1 000种以上有致畸作用，引起人类发育异常的毒物约40种，其原因可能是人群暴露剂量没有达到阈值水平，或可能是物种之间的差异，动物模型不完全合适。美国毒理学家Wilson曾提出确定人类新致畸物的标准：①一种特殊的缺陷或几种缺陷并发（综合征）的频率突然增加。②缺陷增加与某种已知环境改变（如一种新药的广泛使用）相关。③在妊娠的特殊阶段已知暴露在某种环境的改变，产生有特征性缺陷的综合征。④缺少妊娠时引起特征性缺陷婴儿的其他共同因子。

在发育毒物危险性评价过程中，发育毒性实验资料主要用于：①药物对人体的危险性（暴露多是自愿、剂量较高）的评价；②环境物质对人体的影响（暴露多是被动、剂量较低）的评价。

1. *药物*　1979年，美国FDA在药物评价中使用“孕期用药”分级法，用字母A、B、C、D和X将化学物对人类孕体的危险性分级。

A级：在严格控制条件下，受试药物对孕母无任何危险性。

B级：较C级药物的危险度低。

C级：不能排除危险性。如药物无人类实验资料，动物毒性资料暂无或有一定的胎体毒性，但其治疗作用大于不良影响时，该药物属C级。

D级：药物的危险度比C级高。

X级：妊娠期禁用。是指动物或人体观察、流行病学研究或药物上市后的调查报告提示药物的胎儿毒性大于对患者治疗作用。

2. *环境化学物*　发育毒性实验危险度评价旨在确定能使相关实验动物模型产生效应的最低染毒剂量、途径、频度和时间，获得NOAEL。将其结果外推到人需要经过安全系数或不确定系数的修正。当把动物实验结果外推到人时，若无确切的直接外推证据，一般设立一些缺

省的猜测值,设立猜测值的条件:①实验动物发育毒性物质对人类胎儿发育期可能有潜在的危险性;②考虑到发育毒性的4种表现;③人类发育毒性表型与实验动物可能不一致;④若符合条件,用最适当的动物种类评价受试物的人类危险度,否则用最敏感的物种;⑤通常要估计发育毒物剂量-反应关系曲线的阈值。令人注意的是,儿童暴露于环境毒物的形式与成人不同(如儿童在地板上爬、把手指或其他异物放入嘴里等),对发育毒物的敏感性使他们更易受到影响。1996年,美国在"食品质量保护法案"中规定,在推算允许摄入量时,如果考虑儿童、有蓄积效应的毒物、综合暴露(同一化学物多种暴露方式)以及内分泌干扰物等因素,安全系数是通常情况的10倍。

化学物发育毒性机制尚未完全明了,故无完全统一的危险度评定方法。环境化学物发育危害一般参考致畸性大小,实际应用中可根据具体情况选择以下评价和分类方式。

(1) 按致畸指数评价和分类:致畸指数是指化合物对母体动物的 LD_{50} 与胎体最小致畸剂量的比值。通过致畸指数可判断致畸带宽窄和致畸性大小。致畸指数小于10为一般不具致畸作用;10~100为有致畸作用;大于100为强致畸作用。

(2) 按致畸潜力和安全系数评价和分类:1989年,国际生命科学学会(ILSI)根据动物实验中发育毒性的效应类型、致畸严重性和发生率,将化学物的致畸作用分为A、B、C和D共4类。具体分类标准如表7-5。2005年,WHO修订的《全球化学品统一分类和标签制度》(Globally Harmonlzed System of Classification and Labelling of Chemicais, GHS)也列出了生殖毒物的健康危害分类和分级标准。

表7-5 化学物致畸作用参考分类标准

分类	最小母体中毒剂量与最小致畸量的比值	畸胎率	较低剂量时畸形类型	靶细胞	安全系数范围
A	远>1	高,与剂量有关	有特定的器官系统	特定细胞	~400
B	>1或两剂量间有很大重叠	高,与剂量有关	一般为多发性,也可能有特定的特点	特定细胞	~300
C	<1	低,但与剂量有关	无特异性,广泛多发	泛化,非特定细胞	~250
D	母体中毒时无致畸	—	—	不详	~100

(杨惠芳,黄 敏)

第八章 靶器官毒理学

靶器官毒理学(target organ toxicology)是研究外源性化学物质与机体交互作用,导致机体不同组织、器官反应与损害的一门毒理学分支学科。这种交互作用既包括外源性化学物质(或者其代谢产物)对机体的作用,也包括机体对外源性化学物侵入的应答。本章主要介绍了肝脏毒理学、肾脏毒理学、免疫毒理学、神经和行为毒理学及其他系统的毒理学如呼吸毒理学、心血管毒理学、血液毒理学及皮肤毒理学等。

第一节 肝脏毒理学

一、肝脏的生理与肝损伤

大量工业化合物和治疗药物已被证实能损害肝脏。科学家们已确证化学物质损伤特定人群的肝细胞的机制。对肝细胞基础的认识需要知道肝脏的主要功能,肝脏的组织结构和肝脏排泄即胆汁的形成过程。

(一) 肝脏的解剖与生理学

1. 肝脏的功能　肝脏在肠道和身体其他部分之间处于非常重要的位置,这有助于它起到维持机体代谢内环境稳定的重要作用。静脉血从胃和肠流入门静脉,再进入肝脏,继而进入体循环。肝脏是处理摄入的营养物质、维生素、金属元素、药物、环境中毒性物质和细菌代谢废物的第一个器官,可通过有效的清除或吸收过程摄取血液中的这些物质,并将其代谢分解、储存或排泄进入胆汁。

当毒性物质抑制或阻止肝脏的转化和合成过程时,即使没有可察觉的细胞损伤,也会发生肝功能不全,当毒性物质引起较多肝细胞死亡和慢性损伤导致细胞被无功能的瘢痕组织取代时,也会出现肝功能障碍。

2. 肝脏的结构　肝脏被经典地划分为六边形的小叶,肝小叶分为 3 个部分:中心小叶、中间带状区和门静脉周围区。肝功能单位是指腺泡,腺泡基质是由肝门静脉终端分支和肝动脉形成,并沿肝门向外延伸。腺泡有 3 个区带:区带Ⅰ接近于血液入口,区带Ⅲ邻接肝门静脉终端,区带Ⅱ介于它们之间,这 3 个区带几乎和肝小叶的 3 个部分相重叠。

肝脏窦状隙是肝细胞索之间的通道,在这里,窦状隙内的 3 种主要细胞是窦内皮细胞、库

普弗细胞(Kupffer 细胞)和 Ito 细胞(常称为贮脂细胞和星状细胞)。窦状隙是由稀疏不连续的拥有大量孔隙的内皮细胞排列而成。这些孔隙允许小于相对分子质量 250 000 的分子通过内皮细胞和肝细胞之间的间隙(组织间隙)。库普弗细胞是位于肝脏的巨噬细胞,位于窦状隙管腔内的库普弗细胞吸收和降解微粒物质,分泌细胞因子,也可充当抗原递呈细胞。Ito 细胞位于内皮细胞和肝细胞之间,Ito 细胞合成胶原并且是体内储存维生素 A 的主要场所。

3. 胆汁的形成　胆汁是一种黄色液体,包含胆盐、谷胱甘肽、磷脂、胆固醇、胆红素和其他有机阴离子、蛋白质、金属离子和外源性物质。胆汁是从小肠吸收脂类营养物质,保护小肠免受氧化损伤和清除内源性和外源性物质的必要条件。胆汁形成初期为肝细胞转运胆盐、谷胱甘肽和其他溶质进入胆小管。胆小管在肝细胞之间形成通道并且互相连通,在肝脏内形成一连串更大的通道或管道,最后与大的肝外胆管合并形成一个共同的胆总管。胆汁释放进入十二指肠之前储存在胆囊并在胆囊中浓缩。

与毒性物质有关的胆汁形成障碍有可能对某些人产生不利的影响,这部分人可能因其他因素导致胆汁分泌处于临界状态。例如,新生儿因胆盐合成功能不全,窦状隙、小肠转运体的表达延迟,在使用拮抗胆红素胆道分泌的药物时,更易出现黄疸。

4. 肝损伤和肝毒物的类型　肝脏对于化学物质损伤的反应决定于损伤的强度,受影响细胞的数量以及损伤的急缓(急性或慢性)。

(1) 脂肪肝:又称为脂肪变性,是由肝脏中脂质的沉积所致。脂肪肝源于脂质的代谢紊乱。脂肪变性是许多排泄的毒性物质急性损伤后的常见反应。毒素诱导的脂肪变性常常是可逆的,不会导致肝细胞死亡。代谢抑制剂乙硫氨酸、嘌罗霉素和环己亚胺能引起脂肪的聚集而不引起细胞的死亡。

(2) 细胞死亡:肝脏细胞可以通过两种不同的方式死亡——坏死和凋亡。坏死的显著特性是细胞肿胀、渗漏、核衰变和炎症细胞的侵入。凋亡的显著特点是细胞收缩、核裂解、凋亡体的形成和炎症细胞的侵入。

当肝细胞发生坏死时,有关的肝细胞膜渗漏可以通过生化手段检测到,如测定血浆(或血清)中来源于肝细胞浆的丙氨酸氨基转换酶(ALT)和 γ-谷氨酰转肽酶(GGT)。肝细胞的坏死以灶性、区带或全小叶性(广泛)的形式出现。灶性细胞坏死的特点是单个或小簇肝细胞随机、散在的坏死。区带坏死指的是在某功能区域的肝细胞坏死。全小叶性坏死是大量肝细胞的死亡,只有极少数存活。

毒素诱导的肝细胞损伤机制包括脂质过氧化、与细胞大分子结合、线粒体损伤、细胞骨架的破损和大量钙的流入。

(3) 胆汁淤积:生理学将其定义为胆汁形成量的减少或胆汁溶质的分泌减少,胆汁阻塞的生化特点是正常情况下在胆汁中浓缩的物质,尤其是胆盐和胆红素的血清水平升高。当胆汁分泌微黄色胆红素的功能出现障碍,色素将聚集在皮肤和眼,产生黄疸进入尿液,使其变为亮黄色或暗黑色。毒素诱导的胆汁淤积可能是短暂的,也可能是慢性的;当出现大量的胆汁淤积,则会伴随细胞肿胀、细胞死亡和炎症发生。许多不同类型的化学物质均可引起胆汁淤积。

(4) 胆管的损伤:肝内胆管的损伤(此管道可将胆汁从肝脏转移至胃肠道)称为胆管破坏性胆汁淤积,反映胆管损伤的一个有用的生化指标为血清中碱性磷酸酶的活性,此外,血浆中胆盐和胆红素的水平也会升高,此点在胆汁淤积时也会出现。在使用单剂量的胆管破坏性物质后,最初的损伤包括胆管上皮细胞膨胀,胆管管腔内损伤细胞的碎屑残留和门静脉中炎症细胞的侵入。引起胆管损伤的毒性物质可导致胆道增生和纤维化,类似肝硬化;另一胆管

损伤的标志为胆汁缺乏，即胆汁消失综合征，这种情况在接受抗生素治疗的患者中已有报道。

(5) 窦状隙损伤：窦状隙腔道的扩张、堵塞或其内皮细胞壁的进行性损伤，会破坏窦状隙功能的完整性(窦状隙是肝细胞之间的通道，负责全肝脏的血液供应)。当血红细胞进入窦状隙时，腔道将发生堵塞。使用大剂量的对乙酰氨基酚会发生这些改变。广泛的窦状隙堵塞的结果就是使肝脏淤血。

窦状隙内皮质的持续损伤将导致内皮质出现缝隙，继而使屏障的完整性瓦解，伴随着红细胞困于窦状隙内。这些窦状隙的破坏被认为是血管紊乱，即所谓的静脉闭塞病的早期结构特征，这种疾病多发生在吡咯双烷生物碱(存在于草本茶类和化疗药物中)暴露后。

(6) 肝硬化：肝硬化的特征是直接损伤或炎症导致的大量胶原蛋白纤维的堆积。由于持续的化学损伤，受伤的肝细胞组织转变为纤维瘢痕。由于长期的胶原蛋白沉积，肝脏的结构被分割为相互连接的纤维组织。当纤维瘢痕包绕、再生肝细胞形成假小叶时，纤维化进展为肝硬化，这时肝脏通过残余正常肝组织来完成其重要的功能。肝硬化是不可逆的，且预后很差，肝硬化通常是由于反复暴露于化学毒素而引起的。

(7) 肿瘤：化学诱导的肿瘤包括起源于肝细胞或胆管细胞的肿瘤，以及起源于窦状隙线性细胞的罕见恶性血管肉瘤。肝癌已被证明与雄性激素的滥用以及过多食用黄曲霉污染的食物有关。另外，二氧化钍(放射性钍元素的二氧化物)在库普弗细胞和窦状隙的巨噬细胞中聚集，在相当长的半衰期内释放出放射活性物质。多种肝肿瘤均与二氧化钍暴露有关。

(二) 肝损伤因素

肝脏是一个解毒器官。由于存在首过效应，肝毒性物质位点特异性损害因素的影响是很明确的。摄入的位置和特定过程，以及胆汁分泌都会导致肝脏比身体其他组织的毒物暴露水平要高，尤其在某些类型的肝脏细胞中暴露水平更高，另外，生物活化反应的巨大活性影响近似毒物的暴露速率。

使用独立的灌流肝脏，独立的肝细胞和细胞块的体外系统可以在没有其他系统的影响下，进行不同难度水平的观察，可用于确定肝损伤的因素和机制。使用共同培养或可灭活指定细胞类型的物质的模型能够证明某种细胞的作用及不同类型细胞间的相互作用。整体动物模型对损伤进展和慢性损伤反应的评价也是很重要的。

1. *摄取和浓缩*　亲脂性药物和环境污染物很容易分布到肝细胞中，因为窦状隙具有膜孔的上皮细胞，使血液循环中的分子和肝细胞之间发生紧密的联系。富含生物膜的肝脏可浓缩亲脂性物质，作为窦状隙转运体的底物，使其他的毒性物质能快速地从血中分离出来，鬼笔(来自一种蘑菇)和微囊藻素(来自于一种蓝绿色藻类)可作为一个典型的例子，用来阐述毒素通过肝窦状隙广泛地被肝细胞摄取，进而损害肝脏的过程。维生素 A 的肝毒性最初是影响窦状 Ito 细胞，该细胞可主动地提取、储存维生素 A 和钙，而金属镉的肝毒性在肝细胞不能用金属硫蛋白来结合它时，会表现非常明显。肝细胞有助于维持铁的稳态，它是通过受体介导的过程从窦状隙中提取这种必需金属，并以三价铁蛋白的形式储存。

2. *生物活化和减毒*　肝细胞的Ⅰ相酶能将外源性物质转化为活性亲电代谢产物。此外，肝细胞Ⅱ相酶可为分子添加极性基团，这有助于后者从体内消除。Ⅱ相酶的反应常产生稳定的、无活性的代谢产物。一般而言，在Ⅰ相酶和Ⅱ相酶作用之间的平衡决定了一种活性代谢产物是否会激发肝细胞损伤或安全解毒。

(1) 乙醇：与生物活化/解毒活性的平衡有高度临床相关性的遗传条件是指控制乙醇两步

代谢酶的多态性。乙醇由乙醇脱氢酶变为乙醛而具有活性，有活性的乙醛由乙醛脱氢酶催化变为乙酸而解毒。这两种酶都呈现遗传的多态性——一种具有快速活性的乙醇脱氢酶和一种具有慢速活性的线粒体乙醛脱氢酶，结果导致高浓度的乙醛产生。将近50%的亚洲人拥有慢速的乙醛脱氢酶，而白种人没有。具有这种慢速乙醛脱氢酶的人食用乙醇后，会出现由高浓度乙醛引起的脸红、恶心等不适症状。

(2) 细胞色素P450酶：细胞色素P450酶依赖的生物活化作为肝毒性的机制，即使对于所谓安全的化合物来说，也是非常重要的，因为一些细胞色素P450酶在生物转化反应中会产生活性氧，后者可导致肝损害。CYP2E1产生的活性氧和其他的自由基是严重的晚期肝损害病因学中的一个因素。

除了CYP2E1外，CYP3A被证明与民间药用的石蚕属植物(唇形科 *chamaedrys L.*)引起的肝毒性有关。系统性实验研究表明，CYP3A在将石蚕属植物成分转化为活性亲电物质的过程中起至关重要的作用。

(3) 四氯化碳：细胞色素P450依赖的CCl_4转变为·CCl_3，然后变为CCl_3OO·的过程是将外源性物质生物转化为自由基的典型例子，并可引发氧化损伤。在细胞色素P450减少的情况下，暴露于CCl_4下的肝脏损害减轻。

(4) 对乙酰氨基酚：大量应用止痛剂的肝毒性是阐明已明确的因素(例如：食物、药物、糖尿病、肥胖症)如何增强肝毒性的范例。对乙酰氨基酚一般的治疗剂量是没有肝毒性的，因为大部分对乙酰氨基酚经葡萄糖醛酸化或磺化后解毒，只有极少数药物活性增强。大剂量使用对乙酰氨基酚的肝损害在空腹及其他使谷胱甘肽耗尽的条件下更为严重，也可通过N-乙酰半胱氨酸加速谷胱甘肽细胞合成的治疗方法来减轻肝损害。

使用大剂量的对乙酰氨基酚导致肝毒性后，醇可使对乙酰氨基酚的肝毒性作用增强，这种增强作用常常是由于乙醇诱导CYP2E1，而后者介导对乙酰氨基酚活化为亲电的N-乙酰冬氨酸-P-苯醌亚胺(NAPQI)。CYP3A的诱导剂包括许多药物和食用的化学物质，潜在地影响对乙酰氨基酚的毒性。值得注意的是对乙酰氨基酚肝毒性的“两次攻击”理论是指一种药物的活性代谢产物初始作用于肝细胞，使其易受到活性含氮物质(如过氧化亚硝酸盐)的毁灭性打击。

3. *窦状腺细胞活化*　在急性和慢性暴露于肝毒性物质后，库普弗细胞和Ito细胞出现形态学上的激活表现。激活或灭活库普弗细胞的预处理可适当减轻主要毒性物质的损害程度。维生素A激活的库普弗细胞可很大程度地提高CCl_4的急性毒性，而当动物被给予库普弗细胞灭活剂时，这种增强作用不会出现。活化的库普弗细胞可分泌一定量的可溶性细胞毒素，包括活性氧和活性含氮物质。长期和短暂暴露在乙醇中可直接或间接地影响窦状隙细胞。

4. *炎症和免疫应答*　嗜中性粒细胞、淋巴细胞和其他炎症细胞迁移至已受损的肝脏部位是许多化学物质导致肝毒性的识别特征。事实上，令人误解的术语肝炎指的是任何侵害导致的肝损伤，受损后肝细胞的坏死与炎症细胞的侵入有关。

在反复暴露于化学物质(通常是药物)导致的肝毒性中，偶尔可观测到免疫应答反应，个别人中偶尔发生的、不可预期的免疫应答即认为是高敏反应。当治疗停止时，毒性反应停止，而再次给予药物或治疗重新开始时，毒性反应再度发生，这时就要考虑免疫介导反应了。尽管这种理论已被广泛接受，但免疫应答只见于乙醇、氟烷和其他几种肝毒性物质。

二、肝毒物的毒性评价

(一) 整体动物实验

用整体动物实验来评价化学物对肝脏的毒性作用主要分为两方面的检测：一是对肝损害的形态学评价；二是对肝损害的功能进行较全面的评价。

1. 肝损害的形态学评价

(1) 大体解剖：化学物质通过不同途经、不同时间、不同剂量给实验动物染毒，要了解化学物质对实验动物的肝损伤程度，首先是对实验动物进行大体解剖，通过肉眼对肝脏进行仔细观察，并称重计算脏器系数。

(2) 光学显微镜检查：对进行病理解剖取材并用甲醛溶液浸泡的肝组织用石蜡包埋、苏木素和伊红染色，然后再切成 5～6 μm 肝组织切片，用光学显微镜读片。

(3) 电子显微镜检查：在化学毒物引起的各种亚细胞结构的改变，以内质网的改变最早。粗面内质网的损害以核糖体脱落为主，线粒体的受损表现为肿胀。

(4) 免疫组化：目前免疫组化技术用于蛋白质包括肝脏中酶的检测已经非常成熟。很多检测需要使用冷冻切片。

2. 肝损害的功能学评价　实验动物肝损害的功能评价实验分为 3 类，主要是血清酶检测技术、肝脏排泄功能检测以及肝脏组织化学成分的检测。

(1) 血清酶学方法：肝脏受到损伤之后必然会引起相应的酶的变化，而通过检测释放入血的肝酶活性，就可以了解肝脏的损伤情况。对于肝脏损害的特异性和敏感性的不同，将血清酶分为 3 组：第一组，主要包括碱性磷酸酶(AP)、5′-核苷酸酶(5′-NT)和 γ-谷氨酸转肽酶(γ-GT)；第二组，天冬氨酸转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)、山梨糖醇脱氢酶(SDH)；第三组，磷酸肌酸激酶(CPK)和胆碱酯酶(ChE)。

(2) 肝脏排泄功能：化学物可以原形或代谢产物经肝脏排泄，经胆汁排泄的化合物根据排泄时所测得的胆汁/血浆浓度比值被划分为 3 类：①A 类物质，包括钠离子、钾离子、氯离子以及葡萄糖，其比值约为 1.0；②B 类物质，如胆盐、胆红素、BSP 和许多外源物，其比值大于 1.0；③C 类物质，为一些大分子，如菊粉、磷脂、粘蛋白和白蛋白，其比值小于 1.0。

(3) 肝组织化学成分的改变：对肝脂质含量、脂质过氧化产物、蛋白质合成、DNA 合成、DNA 复制和活性代谢产物进行测定。

(二) 肝损害的体外试验及评价

肝损害的体外测试方法，在评价某些特定化学物对肝脏的中毒机制的研究时显得特别有价值，主要是实验条件可以人为地控制，因此实验结果的重复性也相应增加。

1. 离体灌流　离体灌流肝实验是介于体内与体外实验之间的实验。它运用体外肝灌流技术，在保持肝组织结构完整的情况下，研究毒物对肝生物合成功能、物质代谢、转运与排泄等过程的影响。

2. 肝匀浆实验　本实验常用于毒物代谢、蛋白质合成能力及脂质过氧化作用的研究，但是该实验有一定的缺点，主要是缺乏正常存在的细胞内各细胞器之间的生理调节。

3. 肝薄片孵育实验　近年来，大鼠的肝薄片实验改进后被用来观察毒物对大鼠肝细胞膜的损伤和对脂质分泌功能的抑制作用。

4. 原代肝细胞培养实验　分离大鼠的肝细胞，进行常规培养，细胞在培养一段时间后，细胞的形态和数量达到实验要求时即可用于检测化学物对肝细胞的毒性研究。

三、肝脏毒性生物标志物

（一）分类

肝脏毒性的生物标志物多用血清酶类。最早使用各种氨基转移酶，以后又逐渐发展到其他酶类，如腺苷脱氨酶、山梨醇脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、谷胱甘肽-S-转移酶等。血清蛋白和生化物质如胆汁酸、胆红素、透明质酸等亦有应用。近年来，以某些尿液标志物和呼气实验来反映肝功能也有所进展。

按照反映的意义，肝脏毒性生物标志物可分为以下五大类。

1. 反映肝细胞损害的标志物　血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、腺苷脱氨酶、谷胱甘肽-S-转移酶、乳酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、精氨酰琥珀酸裂解酶、异柠檬酸脱氢酶、山梨醇脱氢酶、醛缩酶等。

2. 反映肝脏分泌和排泄功能的标志物　血清胆红素、血清总胆汁酸、吲哚氰绿滞留率等。

3. 反映肝脏合成功能的标志物　总蛋白、白蛋白、前白蛋白、胆碱酯酶、总胆固醇、凝血酶原时间、卵磷脂胆固醇酰基转移酶、凝血因子等。

4. 反映肝脏代谢转化能力的标志物　氨基比林、非那西汀和色氨酸代谢实验等。

5. 反映肝脏纤维化和硬化的标志物　单胺氧化酶、脯氨酸肽酶、Ⅲ型前胶原、层黏蛋白、Ⅳ型胶原、透明质酸、抗线粒体抗体等。

（二）肝细胞损害标志物

血清酶标志物常被用来反映肝细胞受损。细胞膜的通透性增加，或肝细胞坏死，细胞内的酶释放入血液循环，使血液中酶的水平升高，因此检测血清酶水平可评估肝细胞受损的程度。目前为提高诊断率，从3个方面进行研究：①寻找更特异性、更敏感的酶；②观察两个酶的比值；③检测同工酶。

1. 氨基转移酶　丙氨酸氨基转移酶（ALT），血清ALT参考值小于50单位，是肝细胞实质损害的主要标志。它存在于肝、肾、心肌、骨骼肌、胰、脾、肺、红细胞和血清中，以肝脏含量最高，主要存在于胞浆中。肝细胞内ALT浓度比血清高1 000～5 000倍，如果释放的酶全部保持活力，只要1%的肝细胞坏死，可使血清酶活力增加1倍。ALT缺乏特异性，与肝脏病理组织改变缺乏一致性。

天冬氨酸氨基转移酶（AST）广泛分布于体内，以心肌含量最高，肝、肾次之，故血清中AST活性升高应排除心肌病变后才考虑肝损害。测定同工酶则意义更大。

在肝细胞内ALT主要分布于胞浆中，而AST主要分布于线粒体，为了提高血清氨基转移酶测定的诊断价值，可进一步测定AST/ALT比值。在肝细胞浆内AST/ALT之比为0.6∶1，而在整个肝细胞内两者之比为3∶1。轻度肝损害时AST/ALT比例下降，重度肝损害时比值上升，因此测定该比值可作为判断肝损害程度的指标。

2. 腺苷脱氨酶　腺苷脱氨酶（ADA）以同工酶形式广泛存在于人体各组织中，肝细胞内90%存在于胞浆内，血细胞内酶活性约为血清的40～70倍，故检测时应避免溶血。对于反映急性肝损害，该酶与氨基转移酶相似。但是，血清ADA测定有氨基转移酶不具备的优点：临床上发现急性肝炎恢复期ADA升高的阳性率高于氨基转移酶，提示在反映肝炎的残余病变

方面较后者为优。慢性肝病尤其肝硬化 ADA 阳性率高于氨基转移酶。阻塞性黄疸时，ADA 正常，故有助于鉴别黄疸。

3. 乳酸脱氢酶　乳酸脱氢酶(LDH)在体内广泛分布，肝病时血清 LDH 升高，但其敏感性远逊于氨基转移酶，且许多肝外疾病如心肌梗死、肺梗死、溶血时也升高，故对肝损害缺乏特异性。就肝病而言，LDH 同工酶的测定有重要价值。LDH 共有 5 种同工酶：$LDH_1 \sim LDH_5$，其中 LDH_1 主要存在于心肌内，LDH_5 主要存在于横纹肌和肝内。正常人血清 $LDH_2 > DH_1 > LDH_3 > DH_4 > LDH_5$，心肌病变时 LDH 升高，$LDH_1 > LDH_2$，肝病时以 LDH_5 增加为主，$LDH_5 > LDH_4$。

4. 谷胱甘肽-S-转移酶　谷胱甘肽-S-转移酶(GST)在肝细胞中主要分布于胞质，参与肝细胞对胆红素、胆汁酸等的摄取、转运。GST 分子量较氨基转移酶小，更易透过肝细胞膜，肝损害时血清峰值出现比氨基转移酶早且高，因此测定 GST 是反映急性肝细胞损害的敏感指标。又由于其半衰期短(1～8 小时)，所以峰值出现后迅速下降，比氨基转移酶早降至正常，这有助于识别肝细胞损害的终止时间，即当 GST 活性下降时，即使氨基转移酶仍高，提示肝细胞损害不再继续。目前认为血清 GST 活性是反映肝细胞坏死最敏感的指标，其敏感性优于氨基转移酶。

5. 其他肝细胞损害标志物　血清山梨醇脱氢酶(SDH)的活性增高与肝病的特异性明显高于 ALT 和 AST，可作为肝功能检测的特异性指标。异柠檬酸脱氢酶(ICD)存在于肝、肾、骨骼肌、肠、红细胞内，在肝细胞内存在于胞质中，血清中酶活力升高实际上仅见于肝病。在急性、慢性肝细胞性病变时 ICD 的改变类似氨基转移酶，但不如后者敏感。

谷氨酸脱氢酶(GDH)主要存在于肝脏且仅存于线粒体中，理论上血清 GDH 的特异性较氨基转移酶高。酒精性肝病时肝损害主要发生于肝中央小叶，故血清 GDH 活力可作为反映酒精性肝病的良好指标。甘胆酸(CG)反映肝细胞的损害比目前临床上常用的 ALT 等更为敏感，当肝细胞受损或胆汁淤积时，血清中 CG 含量就明显增高，能早期发现轻度肝损害，并有助于确定慢性肝损害的病情严重程度。

第二节　肾脏毒理学

一、肾脏的解剖及病理生理

肾脏可将代谢产物排出体外，合成和释放肾素和促红细胞生成素，调节细胞外液量和血浆渗透压，维持水、电解质和酸碱平衡，因此哺乳动物肾脏功能的完整性对维持整个机体内环境的稳定起很重要的作用。

(一) 功能解剖

在肾脏的冠状切面上可见肾实质分为皮质和髓质两部分。皮质要接收 90%的血流量，髓质接收 6%～10%，乳头接收 1%～2%。肾脏的功能单位可分成 3 个部分：血管部分、肾小球部分和肾小管部分。

(二) 肾脏的病理生理反应

1. 急性肾衰竭　肾毒性损害最常见的表现是急性肾衰竭(ARF)，其特征是肾小球滤过率(GFR)急剧减少，导致氮质血症或血液中出现含氮废物。

管状结构的完整性依赖于细胞与细胞间及细胞与基质间的连接。有人假设当受到化学物质或低氧血症的损伤后，非致命性损伤、凋亡和肿胀的细胞与基膜的黏附力受损均会导致上皮细胞间出现裂隙，发生滤液回漏和 GFR 的降低。这些分离的细胞可能聚集在管状系统的内腔（细胞与细胞黏附），或黏附于上皮细胞下游，导致管路堵塞。

2. *中毒后的调节* 肾脏有很强的代偿能力。单侧肾切除术后，残余肾的 GFR 能增加 40%～60%。单肾 GFR 代偿性的增加，同时伴有近曲小管水和溶质的重吸收成比例增加，以维持球管平衡。

两个最明显的细胞适应性反应是诱导产生金属硫蛋白和应激蛋白。热休克蛋白（HSPs）和糖调节蛋白（GRPs）在肾脏中不同类型的细胞及亚细胞结构内分布有差异。这些蛋白质参与维持正常的蛋白质结构和受损蛋白质的降解有助于复原和修复，因此是毒性损害的防御机制。

3. *慢性肾衰竭* 长期暴露于各种化学物质可使肾功能出现渐进性恶化。肾单位受损后，肾小球压力和血流量适应性增加，从而增加残余的有功能肾单位的 GFR，进而维持全肾的 GFR。随着时间的推移，这些改变就会失代偿，发展成局灶性肾小球硬化，然后导致肾小管萎缩和间质纤维化。残余肾单位的肾小球压力和血流量代偿性地增加，还可能会造成毛细血管的机械性损伤，导致通透性改变。

二、易感性及生化机制

（一）肾组织对毒性损伤的易感性

肾脏的解剖和生理特性决定了它对毒物的易感性。虽然肾脏重量约为身体的 0.5%，但它接受了 20%～25%的心脏静息搏出量，因此体循环中大量的化学物或药物可随血流到达肾脏；化合物重吸收后在肾小管中被浓缩，使某些在血浆里无毒的化合物在肾小管内达到中毒浓度；肾小球滤过的毒物在肾小管内不断浓缩，使一些相对不可溶的化合物在肾小管的管腔内沉积而引起阻塞，进而产生急性肾衰竭。

（二）肾细胞损伤的生化机制

1. *细胞死亡* 肾细胞损伤最终导致细胞死亡，可以是坏死，也可以是凋亡，两者在形态和生理上有很大的差别。凋亡是有严密调控的过程，往往影响散布的个别细胞，细胞保持完整而细胞容积减少，最终细胞变成小碎片，并被毗邻的细胞和吞噬细胞所吞噬，无炎症反应。坏死常累及一大团细胞，细胞肿胀，容积增大，细胞破裂，内容物溢出，伴有炎症。一般肾性毒作用都是由细胞坏死而引起细胞死亡。

2. *毒性介质* 一种化学物质可以通过各种机制引起细胞损伤。它可能与细胞内大分子物质发生内在的反应而产生毒性，也可能通过肾脏的生物转化而变为一种活性中间体，也可能通过增加活性氧（ROS）的生成，如超氧阴离子、超氧氢化物和氢氧根基团，诱导氧化应激从而间接损伤细胞。SOD 和活性氮如过氧化亚硝酸盐（$ONOO^-$）可以吸附蛋白质、脂类物质和 DNA 而引起毒性。

3. *细胞容积和离子稳态* 细胞容积和离子内稳态有密切联系，对于肾小管上皮的重吸收也至关重要。毒物一般都是通过与细胞膜作用，增加离子通透性和抑制能量产生而影响细胞容量和离子内稳态。正常情况下，膜的转运可维持细胞内离子的平衡和跨膜离子运动，ATP 的失代偿可以抑制膜的转运。随着 ATP 的耗竭，Na^+，K^+-ATP 酶活性受抑制，引起钾离子

外流，钠、氯离子内流，细胞肿胀，最终细胞溶解。

4. 细胞骨架和细胞极性　外来化学物在早期就可破坏膜的完整性。这些变化是由于毒性物质诱导细胞骨架的组成成分发生改变以及细胞骨架-细胞膜之间的相互作用，或与能量代谢、钙或磷脂的稳态紊乱有关。正常情况下，肾小管上皮细胞对于一定的转运体和酶而言是有极性的，然而在体内缺氧和体外ATP耗竭的情况下，Na^{+}，K^{+}-ATP酶与肌动蛋白之间脱偶联，从肾近曲小管细胞膜的底部转到顶端。

5. Ca^{2+}稳态　Ca^{2+}在肾细胞中的分布是错综复杂的，包括与大分子物质的阴离子位点结合和分散在亚细胞器内。存在于细胞溶胶中浓度约为100 nmol/L的游离Ca^{2+}，是细胞内起重要调节作用的钙库，这个浓度水平是通过位于细胞质膜和内质网的一系列通道和泵来维持的。细胞溶胶中游离钙离子浓度的异常升高可以引起Ca^{2+}依赖性酶降解，如磷脂酶和蛋白质溶解酶，而这些酶可以保护细胞骨架成分的结构和功能的完整性。

三、肾毒性物质

引起肾毒性的化学物很多，有若干种，但主要有以下5类：①重金属，如镉、铋、锑、镓、铟、铅、汞、镍、铬；②卤代烷烃，如溴化苯、一溴二氯甲烷、四氯化碳、氯仿、二溴氯丙烷、1，2-二溴乙烷、1，2-二氯乙烷、环氯丁二烯、戊氯乙烷、三氯乙烯、四氯乙烯、四氟乙烯；③生物毒素，如黄曲霉素B、细菌内毒素、桔霉素、蛇毒；④农药，如五氯苯酚、百草枯、敌草快、甲醚菊酯、氯丹；⑤有机溶剂，如乙烯二乙二醇、二乙烯乙二醇、甲苯、汽油、煤油、柴油；⑥药物，如庆大霉素、万古霉素、丝裂霉素、头孢菌素、非那西丁。下面介绍常见的几种肾毒物。

（一）汞

环境中存在元素汞（蒸气）、无机汞盐和有机汞化合物。元素汞进入体内在红细胞和组织中迅速氧化成无机汞，在组织中无机汞和元素汞的分布是一样的。由于汞对巯基的特殊亲和力，血液中的无机汞都与细胞白蛋白和其他含巯基的蛋白质及谷胱甘肽和胱氨酸结合。

肾脏是无机汞蓄积的主要靶器官，近曲小管的S_3节段是毒性始发部位，随着剂量和接触时限的增加也可累及到S_1和S_2节段。

无机汞引起的急性肾毒性，一般在接触后24～48小时内发生出现近曲小管坏死和急性肾衰竭，尿中刷状缘酶的增加可作为氯化汞造成肾功能不全的早期生物标志物，如碱性磷酸酶和γ-谷氨酰胺转肽酶。而随小管损伤的发展，某些细胞酶也可在尿中增加，如乳酸脱氢酶和天门冬氨酸转氨酶。

（二）镉

慢性接触镉的主要途径是食物和吸烟，可引起肾脏毒性。职业人群也可吸入含镉粉尘和烟尘。镉的生物半衰期长达十年或几十年，可在体内长期蓄积，体内负荷的50%蓄积在肾脏。镉对近曲小管的损伤，主要在S_1和S_2节段，引起糖尿、氨基酸尿、尿钙和尿酶增加，进而可发展成慢性间质性肾炎。作为人类镉肾毒性的早期预测生物标志物，可用尿镉、钙、氨基酸、白蛋白、β_2-微球蛋白、N-乙酰-D氨基葡萄糖苷（NAG）和视结合蛋白。在镉肾毒性中金属硫蛋白起到了很重要的作用。镉进入人体后在血液里与白蛋白相结合，在肝脏中诱导金属硫蛋白的合成，并与镉结合成镉金属硫蛋白。

（三）氯仿

氯仿引起的肾毒性种属差异大，有的种属比较敏感。氯仿引起的肾毒性主要由于它通过

肾细胞色素 P450 代谢形成活性中间代谢物，后者与细胞大分子的亲核基团共价结合。细胞色素 P450 将氯仿生物转化成不稳定的三氯甲烷，释放出 HCl 并形成光气。光气能与水反应产生 2HCl 和 CO_2 并与 2 个分子的谷胱甘肽反应产生二硫碳酸谷胱甘肽，从而造成肾近曲小管的损伤。氯仿毒性的性别差异是不同性别的细胞色素 P450 同工酶差异所造成的，而这些同工酶在氯仿造成的肾毒性中起了很重要的作用。

(四) 四氟乙烯

四氟乙烯在肝脏中由 GSSH 转移酶代谢成 1，1，2，2 -四氟乙烯谷胱甘肽，随胆汁分泌到胆囊和小肠，降解成胱氨酸 S 结合物，最后通过有机阴离子转运系统和钠非依赖性转运系统转运到肾脏。作为胞质和线粒体中胱氨酸结合物 β 溶酶的底物，分解产生氨、丙酮酸和活化巯基，后者能与细胞大分子共价结合。这种胱氨酸结合物与肾细胞蛋白的再结合和肾脏毒性密切相关。造成的损害形态学上以肾近曲小管坏死为特征，主要影响 S_3 节段功能，引起糖尿，蛋白质尿和尿酶增加。在细胞死亡前，还有脂质过氧化物的形成。

(五) 溴化苯

溴化苯除了肝脏毒性外，还有肾脏毒性。与卤烷类毒物一样，引起肾脏毒性与其生物转化有关。溴化苯经肝细胞色素 P450 氧化成溴化酚，并进一步氧化成溴化氢醌(BHQ)，再与谷胱甘肽相结合，形成二谷胱甘肽结合物。这种结合物的肾毒性比溴化苯要大上千倍，造成 S_3 节段形态学的改变和尿糖、尿蛋白和尿酶的增加。它也是 γ 谷氨酰胺转肽酶的底物，最终可转化成胱氨酸和 BHQ 与 N -乙酰胱氨酸的结合物。

四、肾损伤的检测

(一) 肾毒性检测方法

对肾毒性的检测有多种方法，但多数检查首先考虑采用非创伤性检测。其采集的生物样本是尿，尿的标准检测方法包括尿量、尿渗透压、尿蛋白、尿 pH、电解质 Na^+、K^+ 等排泄的检测。如有尿糖、尿蛋白及尿沉渣的改变均提示肾功能有损伤。

检测结果提示有肾功能的损伤，则需要对肾功能做进一步的检测。高分辨率的 ^1H NMR 色谱法可以初步筛查尿液异常代谢产物。而用模式识别的方法检测肾脏的毒性可以得到化学物质作用位点的相关资料。取少量血液可以检查血浆肌酐或血尿素氮的浓度，以观察肾分泌的功能。

在体外进行的实验中，可以将化学物或其代谢产物直接加入肾皮质切片、分离的近曲小管细胞、离体/原代肾小管等用以评价化学物或其代谢产物的毒性。

对肾脏进行组织病理学检查，可以明确化学物是否造成了肾脏结构的改变或破坏，这可以给我们提供第一手有价值的资料。用电子显微镜可以检测肾毒物接触后肾小管损伤的亚细胞定位、肾小球或肾乳头的改变以及线粒体的改变、滑面内质网增生或其他细胞器的改变等。

(二) 常用的肾功能损害的检测

1. 肾小球滤过率　肾小球滤过率(GFR)可以通过测定经肾小球滤过后既不被重吸收、肾小管也不分泌的化学物的排泄和血浆水平而获得。正常成年人 GFR 为 125 ml/min，菊糖的清除通常作为评价肾功能的指标。血肌酐和血尿素氮也是临床上常规用于评价肾小球功能的指标。

2. 肾血流量　因血浆中 80%～90%的对氨基马尿酸(PAH)都被转运入肾脏内，故 PAH 等有机酸可以用来研究化学物质的肾清除功能，以确定流经肾的血浆总量。正常健康成年男性平均肾血流速率约为 650 ml/min。

3. 排泄比　排泄比是肾内化学物质的血浆清除速率(ml/min)/正常人的GFR(ml/min)的值。这是一种评价肾损伤的有效指标。如果比值小于1.0,提示化学物质部分滤过,部分重吸收,也可能存在肾小管分泌;如果此比值大于1.0,则提示化学物的肾小管分泌。葡萄糖等完全重吸收物质排泄比为0;完全被清除的物质如PAH,排泄比可达5.0。

五、肾脏毒性生物标志物

肾脏是化学物及其代谢产物排泄的主要器官。血流量大,存在浓缩机制,因此也是化学物毒作用的主要靶器官。急性肾衰竭患者中,约20%由中毒性肾病引起,而全世界每年新增50万名晚期肾衰竭患者中,至少3.3%由肾毒性物质所致。因此,不断探索反映早期可逆阶段肾损害的标志物至关重要。

肾脏毒性标志物主要为血清(浆)和尿液标志物,而尿液为非创伤性生物材料,故为肾脏毒性标志物最主要来源。取标本无创伤性方法的不断改进使尿液分析更为方便灵敏。

肾脏毒性生物标志物按反映的意义不同可分为以下3类:①功能性标志物:血清肌酐、β_2微球蛋白,尿中高、低分子量蛋白质等;②细胞毒性标志物:肾小管抗原、尿酶等;③生化标志物:二十烷类、纤维连接蛋白、血管松弛素活性、唾液酸等。

第三节　免疫毒理学

一、免疫系统

免疫系统包括免疫器官、免疫细胞和免疫分子3类,各组成成分的功能一般是相互关联的。因此,一旦机体遭遇外来物质侵入,不同类型的细胞和体液成分之间常发生连锁反应,这些反应常包括对外来物质的识别、记忆和反应,从而能够清除和控制外来物质。

免疫器官主要由淋巴组织构成。免疫细胞主要是淋巴细胞,此外尚有一些如单核巨噬细胞等免疫辅佐细胞。免疫分子包括补体、抗体、细胞因子等。免疫细胞不仅定居在淋巴器官中,也分布于皮肤、黏膜等组织。免疫细胞和分子还可通过血液、淋巴液广泛分布全身、发挥免疫功能。

免疫毒理学(immunotoxicology)是在免疫学与毒理学基础上发展起来的一门毒理学分支学科,主要是研究物理、化学和生物因素对机体免疫系统的有害作用及其机制。

1. 先天性免疫　先天遗传生成的天然免疫力,主要由机体正常生理屏障、正常体液杀菌物质及大小吞噬细胞与自然杀伤细胞(NK细胞)等共同构成的三道防线,具有体表外围屏障、体内防御屏障和血-脑屏障功能。

大多数感染性物质通过呼吸道、肠道、生殖泌尿道侵入机体,因此皮肤是一个有效的屏障。通过消化道进入机体的病原体在遇到胃中强酸或消化道微生物时会发生很大的变化。

参与先天性免疫的细胞主要包括自然杀伤细胞(NK细胞)、多形核白细胞和巨噬细胞。NK细胞能识别细胞表面的病毒感染和恶性变化以及抗体覆盖的靶细胞。后者识别形式在细胞介导的免疫中起作用。吞噬细胞包括多形核细胞和单核巨噬细胞,它们从干细胞发育而来,然后被提呈给骨髓系细胞。多形核细胞是功能强大的吞噬细胞,可以清除大部分微生物,诱导炎症反应。

2. 获得性免疫　一旦存在感染性物质,便产生特异免疫反应(特异性),而且记住这种物

质以便将来再次感染时快速产生反应(记忆性)。

获得性免疫主要是由T淋巴细胞介导的特异性细胞免疫及B淋巴细胞产生的抗体介导的特异性体液免疫。获得性免疫具有两个明显的特征:特异性和记忆功能。特异免疫反应发生的必要条件是对抗原的识别和能够与抗原结合的抗体的产生。

抗体被归类为免疫球蛋白,由B细胞产生。在功能上被定义为与抗原发生反应的物质(例如抗羊血红细胞IgM)。免疫球蛋白在结构上分为5种类型:IgM、IgG(及其亚型)、IgE、IgD、IgA。所有的免疫球蛋白都由重链和轻链组成,分为恒定区Fc片断及其可变区。可变区决定抗体的特异性。

3. 体液和细胞免疫　体液免疫是活化的T细胞和B细胞之间的相互作用。抗原特异性的T细胞的活化是从具有MHCⅡ$^{+}$肽链复合物与T细胞受体的相互作用开始的。活化后,再在抗原提呈细胞分泌的白细胞介素1的作用下,T细胞就开始产生T细胞生长因子——白细胞介素2,并为其表达相应受体。随着T细胞的增殖,它们会分泌大量的淋巴因子,从而多方面地影响免疫反应。

细胞免疫一般有两种形式,即迟发型变态反应和细胞介导的细胞毒反应。细胞介导的细胞毒性反应中效应细胞以一种特异方式结合到靶细胞上,然后效应细胞释放溶细胞颗粒于靶细胞上,最终导致靶细胞凋亡。

4. 神经-内分泌-免疫　神经-内分泌-免疫这3个系统的相互作用是双向的。细胞因子、神经肽、神经递质以及激素等是中枢神经系统、内分泌系统和免疫系统相互调节且不可缺少的组成部分。

二、免疫毒性整体评价

(一) 免疫毒理学评价方法

1. 分级测试方案　美国国立环境科学研究所(NIEHS)推荐了一个分级检测方案,此方案包括两级测试(表8-1)。如果一级测试中发现有免疫毒性阳性指标或其他实验提示有免疫毒性则进行第二级实验。

表8-1　免疫毒性检测的两级实验方案(NIEHS推荐)

分级	免疫指标	测试
第一级	免疫病理学	免疫器官病理检查,全血细胞计数
	体液免疫	B淋巴细胞增殖反应,抗体水平
	细胞免疫	T淋巴细胞增殖反应
	非特异性免疫	巨噬细胞活力
第二级	免疫病理学	分级细胞计数
	体液免疫	次生抗体反应
	细胞免疫	迟变性变态反应,T细胞分裂
	非特异性免疫	吞噬实验
	宿主抵抗力	细菌侵袭实验
		寄生虫侵袭实验
		病毒侵袭实验
		肿瘤细胞侵袭实验

2. *免疫毒性方法分类* 依据不同的目的，免疫毒性检测方法可分为：①体内染毒、体内抗原或病原攻击、体内功能评价，如宿主抵抗力实验；②体内染毒、体内抗原或病原攻击、体外功能评价，如空泡实验；③体内染毒、体外抗原或病原攻击、体外功能评价，如淋巴细胞增殖实验；④体外染毒、体外抗原或病原攻击、体外功能评价。这4种方式各有优缺点，应根据不同的目的来选择。

3. *免疫毒性测试程序* 免疫毒性的测试程序应该由一个权威的专业机构提出，并经政府部门认可才行。提出这种程序必须考虑选用方法的灵敏度和特异度(检测出免疫毒性化学物的效能)以及简单快速的特征(实用性)两方面的因素。我国在农药、食品和化妆品安全评价程序中都特别要求有过敏实验内容，但要求检测免疫毒性的系统测试程序至目前为止尚未制订。

(二) 免疫毒性实验方法

1. *免疫毒性反应中非功能性实验* 非功能性实验即指一般性实验，其结果只能反应免疫系统的受损部位，但不能提示可能的作用机制。这类实验的优点是可以在同一个动物身上进行多项实验。

(1) 常规病理检查：主要是指实验动物的常规病理检查，特别是与免疫有关脏器的检查，如淋巴组织的病理学检查，包括有关脏器的重量及脏器系数、组织学检查等。

(2) 免疫球蛋白水平：在亚慢性或慢性暴露后，大鼠血液中基础免疫球蛋白水平(IgG、IgM)水平测定是一个很有用的指标。

(3) 骨髓细胞学检查：骨髓是淋巴细胞和其他白细胞前体的来源，股骨骨髓经冲洗后可以通过染色法或Coulter计数器来检查骨髓细胞。

(4) 免疫组化染色和形态学测量分析：对淋巴细胞表面标记进行免疫组化染色可以深入研究淋巴器官的结构和功能，以发现不同细胞亚群和淋巴室(compartment)的变化。另外，淋巴室的形态学测量分析也可以揭示出这些室的大小变化。

(5) 表面标记物：可以用表面标记物进行外周血淋巴细胞亚群的分析评价，如B细胞、T辅助细胞和T抑制细胞。这些细胞可以用荧光激活细胞分类器进行计数。

2. *免疫毒性反应中功能性实验* 一般来说，功能性实验应在动物给药14～28天后进行。其中，许多功能性实验为体外实验，如吞噬、增殖和溶菌实验。或者，也可以采用未给受试物的动物细胞，直接将受试物加入培养基进行实验。但是，应用这种方法得到的实验结果更难解释，特别是体内代谢过程可能改变受试物的毒性时。如果已知免疫毒性的作用机制，那么使用人体细胞的体外实验将有助于识别其对人体潜在的危害。

(1) 对绵羊红细胞的抗体反应：测定体内抗体对T细胞依赖性抗原SRBC的应答状况。这项实验反应机体在抗原存在的情况下，体内细胞、T细胞和B细胞共同作用，产生免疫应答能力。此实验是目前应用的最为敏感的免疫毒理学实验之一，应作为免疫毒性功能实验的首选。

(2) 巨噬细胞功能：巨噬细胞的吞噬功能既可以是免疫介导的，也可以是非免疫介导的，现在有许多体外实验都可以检测吞噬功能的改变。

(3) NK细胞活性：NK细胞在肿瘤细胞的监视方面起重要的作用，并且是抗病毒的第一道防线。利用血细胞或脾细胞可检测NK细胞的溶细胞活性。

(4) B细胞和T细胞的有丝分裂原：许多物质能够刺激淋巴细胞发生非免疫性增殖反应。

刺激程度可以通过^3H标记的胸腺嘧啶的掺入量来测定。

(5) 混合淋巴细胞反应：混合淋巴细胞反应是测定由免疫刺激引起的T细胞增殖能力。测定时将脾细胞或淋巴细胞与异源刺激细胞相混合。淋巴细胞对非自身抗原的反应(MHC Ⅱ)的反应表现为增殖。

(6) 迟发性变态反应：迟发性变态反应是测定整体动物细胞产生的细胞免疫应答能力。这类实验在评价化学物的细胞介导的免疫功能方面优于体外实验如混合淋巴细胞反应或者细胞毒性T细胞反应。

(三) 外源性化学物质的免疫调节

1. *免疫抑制物质* 可以产生免疫抑制作用的物质有许多种，包括合成化学物和天然物质在内有若干大类、多个品种：卤代芳香环碳氢化合物(包括多氯双苯类、多溴双苯类)、多环芳烃类化合物、亚硝胺类、杀虫剂类(如有机磷类、有机氯类、氨基甲酸酯类)、金属类(铅、砷、汞、镉、铍等)、吸入性物质(氨基甲酸乙酯、烟草、石棉、二氧化硅等)、氧化性气体(臭气、SO_2、NO_2)、芳香碳氢化合物(四氯化碳、单氧乙醚乙烯二醇等)、霉菌毒素类(黄曲霉毒素B_1)、雌激素、雄激素、糖皮质激素、免疫抑制剂(环磷酰胺、硫唑嘌呤等)、滥用药物(大麻、可卡因、海洛因和吗啡)等。

2. *免疫性疾病* 机体的免疫系统在免疫应答的过程中可能损坏正常组织，导致机体免疫性疾病的产生。

(1) 变态反应：产生超敏反应或变态反应，变态反应有4种类型，分别是Ⅰ型变态反应(速发型过敏反应)、Ⅱ型变态反应(抗体依赖的细胞毒性变态反应)、Ⅲ型变态反应(免疫复合物介导的变态反应)和Ⅳ型变态反应(细胞介导的变态反应)。

(2) 自身免疫：主要有自身免疫性疾病和多种化学物质过敏综合征等。

三、风险评价和生物标志物

(一) 风险评价

应用从动物实验中获得的免疫毒理学数据作为人类临床作用的风险预测有一定的局限性，至今没有发现一个免疫实验可以对宿主耐受性的改变有很强的预测能力。人群中感染性物质的致病力的多变性，免疫系统的复杂性，免疫系统的重复性(对外来性物质有多个成分可以发生反应)，这些都可以对化学物质诱导的某些免疫状态改变与人类宿主抵抗性的改变之间关系的量化构成困难。

(二) 免疫毒性标志物分析技术的进展

1. *易感性基因和基因表达分析* 随着分子生物学技术的发展，理化因素造成机体损伤可引起体内与免疫系统相关的分子如cDNA、mRNA、蛋白质、抗体等表达的变化，可以通过生物芯片以及差异基因筛选技术等对其进行分析。生物芯片技术是近年来建立的高通量生物信息获取技术。生物芯片的种类很多，包括蛋白质芯片、抗体芯片、组织芯片、肽芯片、细胞芯片、基因芯片等，可应用于基因表达、基因多态、癌基因、化学品毒性等方面相关基因组或蛋白质组学的研究。差异基因筛选技术是在转录水平研究基因表达差异的方法，包括消减杂交、抑制性消减杂交、差异显示、DNA代表性差异分析(cDNA代表性差异分析、RNA指纹技术)。

2. *转基因、基因敲除技术* 免疫毒性标志物研究，用分子生物学技术将复杂的免疫应答分为几部分，采用转基因、基因敲除小鼠进行观察，可以了解免疫毒物的作用机制。缺乏某种

受体、转录因子、细胞因子也可用于免疫毒理的研究，如用联合免疫缺陷小鼠进行关于理化因素对免疫调节、免疫毒性、超敏反应和自身免疫疾病的研究。

第四节　神经和行为毒理学

一、神经毒物引起的神经系统的损害

（一）神经元病变

以葡萄糖为主要能量来源的神经细胞对缺氧与低血糖状态极为敏感。已知有许多化学物可引起脑缺氧。巴比妥类可导致脑缺氧，尤其是大脑皮质、海马、小脑等处。长期接触CO，由于造成白质弥漫性硬化（白质病），可导致大脑永久性损伤。氰化物与叠氮化合物则能抑制细胞色素氧化酶，引起细胞性缺氧。

毒物可直接影响神经细胞体。甲基汞首先引起核糖体的灶性脱落，然后引起尼氏体分解和消失，特别是在小细胞上。随后细胞核和细胞质发生改变，最后整个神经细胞包括轴突均受到破坏。阿霉素通过插入到DNA，导致双螺旋结构断裂。这种干扰会抑制RNA和蛋白质的合成。甲基汞可以通过血-脑屏障，因而既可影响背根神经节，也可危害中枢神经系统（CNS）的神经元。

有机锡类被用作杀虫剂和增塑剂。这类化学物进入神经系统后，蓄积在细胞体内类高尔基体结构中，导致细胞发生肿胀和坏死。

铝也可以通过血-脑屏障，引起猫和兔的神经纤维变性，从而导致脑病，这可能是阿尔茨海默氏病（Alzheimer's disease）的发病原因之一。

孕妇接触乙醇，可以造成后代包括神经细胞迁移和树突分化异常在内的神经系统畸形。

（二）轴突病变

某些轴突很长，轴突中的基本成分如神经原纤维，并不是在轴突中合成的，而是在细胞体中合成，然后沿轴突输送。因而，毒物可直接作用于轴突，也可通过损害细胞体，而祸基累及轴突。

损伤可发生在轴突的近端或远端。

1. 近端轴突病变　β，β′-亚氨二丙腈（IDPN）会引起这类典型损伤，因而被用作模型来研究运动神经原疾病，如肌萎缩性侧索硬化症。IDPN的早期效应是破坏神经丝缓慢的轴突转运，这可能是由于神经丝的异常磷酸化引起的，而此时胞体中神经丝仍在继续合成。

2. 远端轴突病变　轴突包括3种神经原纤维结构，即神经小管、神经丝和微丝。此外，轴突中还有线粒体和滑面内质网。这些结构对各种神经毒物特别敏感。例如，铊可引起线粒体肿胀和变性；某些有机磷和有机溶剂可造成神经原纤维结构的紊乱，导致远端轴突病变。

某些有机磷化合物，如磷酸三邻甲酚酯（TOCP）、苯硫酸（EPN）和溴苯磷，可导致一种重要的远端轴突病变。这些化学物除了抑制胆碱酯酶外，还可引起迟发性神经病变，主要表现为肌麻痹。长而粗的神经纤维特别容易受累，因此下肢麻痹先于上肢。由于迟发性神经毒作用的严重性，该项潜在危害的测定已列为新的有机磷化合物的常规测试项目。经济合作与发展组织（OECD，1995）和美国环境保护局（EPA，1994）都公布了母鸡一次和反复多次给药的实验指南。迟发性神经毒作用与胆碱酯酶活性抑制无关，因为胆碱酯酶抑制剂，如马拉硫磷、对

硫磷和西维因都不具有这种毒性，但与神经毒性酯酶磷酸化有明显关系。近来许多研究证实细胞骨架蛋白异常磷酸化的增加，可导致轴突的肿胀和神经丝转运速度的下降。

另一类不同的远端轴突病变可由六碳类物质如正己烷和甲基正丁酮引起。这些溶剂如丙烯酰胺，可引起多发性神经病。这两类化学物均可引起轴突中神经丝的显著增生，这可能是某些蛋白质磷酸化改变的结果。接触丙烯酰胺，早期就累及感觉神经，而接触六碳化学物首先影响某些运动神经，较晚累及感觉神经。长春新碱可引起神经原纤维在核周体与轴突处的堆积，破坏轴突神经小管与神经丝，阻断这些超微结构轴突原生质的传递。

氯碘羟喹在20世纪60～70年代间被普遍用于治疗旅行者痢疾，造成了数千例患者神经系统的异常，即诱发亚急性脊髓视神经病(SMON)。在人体试验和动物实验中，氯碘羟喹可引起背根神经节中央轴突和视神经的变性。

远端轴突病变，曾被认为是因为轴突中糖酵解酶活性受损所致。这些酶的功能与神经丝传递有关，神经丝是在核周体合成，沿轴突传送的。这些酶活性的损伤首先影响轴突的远端部分及长而粗的神经纤维，因为后者需要从核周体获得更多的能量。另一种假设认为神经丝受毒物如六碳化学物和丙烯酰胺的直接作用。神经丝位于较长纤维的末梢，接触毒物时间最长，也最早受到影响。

3. *冲动传导阻滞*　许多毒物主要作用于神经细胞膜，这些膜通常保持负的静息电位。当受刺激时，产生动作电位。静息电位与动作电位是由于膜两侧 Na^+ 和 K^+ 浓度的变化所引起，此浓度由 Na^+ 通道维持。河豚毒素通过阻断 Na^+ 通道，从而阻断动作电位的产生。岩生毒素(saxitoxin)由膝沟藻属腰鞭毛虫产生，被石房属巨型蛤类摄取，它也可阻断 Na^+ 通道。食用处理不当的河豚或受污染的蛤类，可造成呼吸衰竭而死亡。但是，岩生毒素与 Na^+ 通道的结合较易恢复。这些毒素已成为研究神经毒物作用方式的有力工具。

4. *突触传递阻滞*　肉毒毒素是一种作用最强烈的生物毒素，由肉毒杆菌产生，可阻滞神经介质乙酰胆碱从运动神经终板的释放，造成肌肉麻痹。与此相反，黑寡妇蜘蛛毒液可以引起乙酰胆碱大量释放，导致痉挛和麻痹。

由破伤风杆菌产生的破伤风痉挛毒素，直接作用于CNS，引起强直性痉挛。它是通过阻断抑制性氨基酸，即γ-氨基丁酸(GABA)和氨基乙酸的释放，而造成痉挛性麻痹。这种蛋白质二聚体的相对分子质量约为150 000，因此无法通过血-脑屏障。但是，它可通过逆向轴突转运，到达CNS。

有机氯农药(DDT)与拟除虫菊酯类的化学结构差别极大，但它们对神经系统的作用却相同，都是延长钠通道的开放，使突触间和神经肌肉接头反复激活。

(三) 胶质细胞和髓鞘

1. *髓鞘细胞*　髓鞘细胞(少突神经胶质细胞和神经膜细胞)的损伤可导致脱髓鞘改变。可引起这类改变的神经毒物有铅，它可能是通过干扰了 Ca^{2+} 的转运，而对神经膜细胞产生了影响。正如所料，降胆固醇药物，如三对丙烯基苯酚可影响髓鞘，因髓鞘中的髓磷脂含量高达70%。但它们在脱髓鞘作用发生前，引起少突神经胶质细胞超微结构的变化。三乙基锡、溴化乙啶和放线菌素是损伤髓鞘细胞的另外几种脱髓鞘毒物。

2. *髓鞘*　对髓鞘的直接作用也可引起脱髓鞘，这类效应一般是由于破坏了膜的结构所致。其他作用机制为：①抑制碳酸酐酶或其他与离子和水的输送有关的酶类；②抑制与氧化磷酸化有关的酶类；③金属的螯合作用。直接作用于髓鞘的神经毒物包括：三乙基锡、溶血卵磷脂、异烟肼、氰酸盐、六氯酚和铅。

铅一直被认为是危害较大的神经毒物，它可影响神经系统的多个部位，包括髓鞘。大部分毒物主要作用于 CNS，但铅首先影响 PNS。此外，铅对运动神经的影响早于感觉神经，可造成“腕下垂”和“足下垂”。

（四）血管与水肿

CNS 和 PNS 中血管系统的通透性，可能随血压的升高或离子渗透压的降低而增加，也可由于接触某些毒物引起。通透性增加，往往会导致细胞外液增多，另外，许多神经毒物可引起细胞水肿。

1. *细胞外水肿* 铅可损伤内皮细胞，并在大脑引起血浆外渗，尤其是在白质比灰质具有更大的顺应性。乳鼠对铅更为敏感是由于血管系统尚未成熟。铅对神经内膜也有相似的效应，导致神经内膜液压的升高和脱髓鞘作用。有机铅如四乙基铅，更易透过屏障，因此在这方面毒性更大。

汞化合物可损伤内皮细胞并增加其通透性。有机砷能够在大脑引起水肿与灶性出血。碲引起神经内膜水肿。慢性酒精中毒也与神经内膜水肿有关。

在六氯苯中毒时，神经内膜水肿也可由髓鞘内水肿引起。这种水肿还可由于机械性损伤伴随华勒变性引起。

2. *细胞水肿* 接触毒物后，神经元各个部分都可能发生水肿。例如，6-氨基烟酰胺影响核周体，氰化物和一氧化碳影响轴突，G 毒毛旋花苷和甲基亚砜影响前神经末梢。

星形胶质细胞与少突胶质细胞水肿可由 6-氨基烟酰胺引起。G 毒毛旋花苷也可影响星形胶质细胞，接触铅也可引起神经膜细胞水肿，铅也能引起细胞外水肿。

三乙基锡和异烟肼也能引起 CNS 髓鞘的水肿，六氯酚可在大脑白质与外周神经引起髓鞘水肿。

二、引起神经系统损伤的化学物质

对神经系统产生毒作用的化学物质以针对神经系统的靶标为依据大体可分为以下 4 类。

1. *可以导致神经元损伤的化学物质* 对神经元损伤包括细胞质、树突、轴突和髓鞘变性，其化学物质主要有铝、砷、铋、铅、锰、一氧化碳、四氯化碳、氯霉素、6-氨基烟酰胺、氰化物、阿霉素、乙醇、无机汞、甲醇等。

2. *可以导致轴突病变的化学物质* 一般毒性物质会导致轴突“化学性横断”，即轴突远端发生横断性变性，其化学物质主要有丙烯酰胺、对溴苯基乙基尿、环氧乙烷、二氧化碳、氯喹、十氯酮、秋水仙素、氨苯砜、氯碘羟喹、二氯苯氧乙酸、二甲氨基丙腈、格鲁米特、金、己烷等。

3. *可以导致髓鞘损伤的化学物质* 这些物质主要有胺碘酮、乙酰基乙基四甲基四氢萘、铜螯合剂、三乙基锡、双三氯酚、派克希林等。

4. *可以影响神经递质的相关化学物质* 主要有阿托品、可卡因、烟碱、安非他明和去氧麻黄碱、软骨藻酸等。

三、神经系统神经毒性的研究方法

1. *中枢神经系统毒性检测* 放射自显影、免疫组化以及细胞化学等方法可以对神经中的大分子物质如蛋白质及核酸进行定位和定量研究，组织器官的功能性研究也得到广泛的应用。神经系统的功能评价通常采用功能观察组合实验，包括水平运动、垂直运动以及总活动水平、惊厥、震颤、重复行为、呼吸模式、步态、排尿、惊吓反应、竖毛反应、瞳孔大小以及光反应、唾液

分泌、额外发声、流泪、握力、肌紧张性等。

2. 分子生物学方法　用于检测神经毒性的分子生物学方法有聚合酶链反应(PCR)、荧光原位杂交技术(FISH)、免疫组化(IHC)、流式细胞检测技术(FCM)、荧光原位末端标记(TUNEL)、神经细胞凋亡检测、基因转染、基因克隆技术、毒理基因组学、毒理蛋白质组学以及表遗传学等技术。

3. 神经病理学方法　主要是应用免疫组化标记物的检测(GFAP的表达量测定)来确定损伤的部位,此外应用电子显微镜技术来确定细胞超微结构改变也是常用的方法之一。

4. 神经电生理学方法　神经电生理的方法是检测神经毒性的敏感指标之一。其常用指标有膜片钳技术、脑电信号、脑诱发电位等方法。

5. 生物化学方法　用生物化学的方法对化学突出传递及神经元递质的合成、储存、释放、再摄取、降解等一系列复杂的过程进行检测,可以了解外源化学物对神经递质的作用方式和强度,利用同位素标记递质类似物对受体的结合特性进行研究,利用酶化学法、酶动力学法可以了解酶在外源性化学物神经毒作用中的改变及意义。

6. 体外实验方法　体外实验模型一般可以分为组织器官培养、原代细胞培养、转化细胞培养和无细胞系统,目前的体外实验方法均已广泛应用于检测外源化学物的生物转化、作用靶点、神经递质释放和吸收功能及神经毒性测定。

第五节　其他系统毒理学

一、呼吸毒理学

(一) 肺部损伤的急性反应

1. 呼吸道的反应性　大的呼吸道有支气管平滑肌环绕,当肺扩张和收缩时可帮助维持呼吸道的紧张性和直径。支气管平滑肌的紧张性正常情况下受自主神经系统调节。刺激物如吸烟、污染物和胆碱样药物如乙酰胆碱、组胺,各种前列腺素和白三烯、P物质和氧化亚氮等可引起支气管收缩。支气管收缩可导致支气管内径减小,对气流阻力的反应性增加,表现为喘鸣、咳嗽、胸部紧压感和呼吸困难,运动可以加重这些症状。

2. 肺水肿　毒性肺水肿表现为肺损伤的急性、渗出性病变,可以改变通气-灌注关系,甚至在其他结构正常的肺泡也限制了 O_2 和 CO_2 的交换。

3. 细胞增生　毒物对肺组织的作用分为可逆性或不可逆性。正常的成人肺组织,在正常环境下不会因细胞死亡而需要修复代替。当受到毒性损伤时,肺实质可以自主修复。A型上皮细胞损伤后会引起Ⅱ型上皮细胞的增生;在呼吸道中,Clara细胞(支气管无纤毛上皮细胞)损伤后会发生增生和分化。血液中细胞迁移,如白细胞穿过肺部毛细血管进入肺泡腔的过程也可能触发有丝分裂。在肺泡腔的其他细胞,如毛细血管内皮细胞、间质细胞和肺泡吞噬细胞也会增生,虽然成纤维细胞过度增生有时可导致肺疾病,但看上去肺仍是一个正常的器官。一般来说,肺组织有很高的自我修复的能力,这样可以减轻许多环境中的毒性损害。

(二) 肺部损伤的慢性反应

1. 肺纤维化　人类发生急性或慢性肺纤维化时,肺组织胶原数量增加。在毒物导致的肺损害中,病理过程与成人或婴儿呼吸窘迫综合征相似。过多的胶原物质不仅在肺泡的间质中

可以看到，而且存在于整个肺泡管和呼吸道细支气管。

Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原是主要的间质成分，比例约是2∶1。在特异性肺纤维化患者与死于急性呼吸窘迫综合征的患者中，Ⅰ型胶原较Ⅲ型胶原增加更明显。与胶原成分的绝对增加相比，胶原类型的转变是否是纤维肺硬度增加的主要原因还不知道。Ⅲ型胶原比Ⅰ型胶原顺应性高，故Ⅰ型胶原与Ⅲ胶原比值的增加可能使肺纤维化更严重。纤维肺中胶原交联的改变也可增加肺的纤维化程度。

2. 肺气肿　肺气肿时，肺组织扩张，顺应性减小。气体交换表面积的破坏可导致肺扩张，并高度膨胀，无法有效地交换氧和二氧化碳。人类肺气肿的主要原因是吸烟，也可以是接触铝、镉氧化物、氮氧化物、臭氧等引起。弹性纤维包绕并支持着肺泡和支气管，在某些情况下，多形核粒细胞释放弹性蛋白酶破坏弹性纤维。

3. 变态反应　这类反应通常因吸入花粉、霉菌孢子、细菌污染物、棉尘、对苯二胺、羽毛等引起。抗原和抗体的反应引起的支气管痉挛导致过敏性哮喘。长期接触可能导致其他肺部损害如慢性支气管炎和纤维化。

此外，吸入霉菌还可引起过敏性肺炎，吸入某些植物性粉尘可引起类似的肺部疾病如农民肺、蘑菇工人肺、蔗渣肺、木尘肺等。最近有报道，吸入纳米颗粒可引起肺肉芽肿也是变态反应的一种。

4. 肺癌　肺癌是男性和女性死于癌症的主要肿瘤。香烟烟雾中含有许多致癌物、协同致癌物和刺激物，已有明确证据表明，吸烟是许多国家肺癌发病的首位病因。除吸烟外，诱发肺癌的毒物还有石棉、砷、铬酸盐、镍、铀、炼焦炉废气、氯乙烯等。人造陶瓷纤维可能也有致癌性，这些物质能启动和促进癌症的发生。此外，许多物质能引起氧化应激而导致健康损害。其他能引起肺癌的因素包括砷、铬酸盐、镍、铀和炼焦炉废气。最近有研究显示，四硝基甲烷是最强的致肺癌化学物之一，其致癌机制尚不清楚。人们还发现，苯乙烯、α-甲基苯乙烯和二乙基苯经吸入后，可被代谢为有毒或有致癌作用的环氧化中间产物。

(三) 已知可引起人肺部损伤的物质

1. 空气中可引起人类肺损伤的物质

(1) 肺过度吸入颗粒物质：当肺中的沉积的颗粒物超负荷时肺泡的清除率减慢。

(2) 氧：氧的毒性是由于部分还原性氧代谢物产生增加导致的。由细胞碎片和蛋白质渗出物组成的透明膜形成是肺氧化毒性的特征性改变。发生急性氧化损伤的动物随后会出现活化细胞的增生。

2. 血液中可引起人类肺损伤的物质

(1) 百草枯(paraquat，1,1-二甲基-4,4-联吡啶二氧化物)：经口摄入除草剂百草枯后可产生广泛的肺损伤。其特征是弥漫性间质性和肺泡内纤维化。

(2) 丁羟基甲苯(BHT)：一种高脂溶性合成抗氧化剂，广泛用于食品添加剂、化妆品和药物。BHT曾是公认的安全化学物，但后来却发现BHT可引起小鼠和大鼠肺弥漫性损害和纤维化。

(3) 野百合碱：野百合碱有许多结构相似的自然界物质，已经证实这些物质存在于谷物、蜂蜜和草药茶中。如通过红细胞运送到肺组织，在肺中可引起内皮损伤，结果产生肺动脉高压和右心肥大。

(4) 抗肿瘤药和皮质激素：最常见引起肺损伤和纤维化的抗肿瘤药物包括氯乙基亚硝基脲(BCNU)、博莱霉素、环磷酰胺、白消安(二甲磺酸丁酯)、丝裂霉素C、金盐、苯丙氨酸氮芥和

氨甲蝶呤,它们可引起间质胶原和Ⅱ型细胞增多。博来霉素几乎是唯一不影响骨髓的抗癌药,但可损伤肺脏,其病理特点是肺泡内蛋白质性物质蓄积、肺泡和间质水肿、肺泡上皮化生和成纤维细胞增生。

(四) 呼吸系统毒理学研究方法

呼吸道吸入染毒方法是研究毒物对呼吸系统的不可缺少的染毒方式,也是研究工业毒物和大气污染物危害的最常用的染毒方式。

1. 全身暴露　动物置于静式或动式染毒柜中。核心是保证柜内毒物浓度分布均匀,又要满足较多动物同时染毒。

2. 头、鼻暴露　这种装置的优点是:①避免了沾染在毛皮上的毒物直接通过皮肤或间接通过胃肠道吸收;②只需要少量测试物。

3. 气管插管、气管切开和气管导管　这几种染毒方法可以保证只有肺部接触受试物,可以精确控制受试物的总量,尤其适用于剧毒、昂贵的受试物。其缺点是超越了呼吸道的防疫系统、存在机械损伤、干扰正常的呼吸气流等。

二、心血管毒理学

(一) 心血管毒物对心脏和血管的毒性作用

1. 心血管毒物对心脏的毒性作用　可以对心脏产生毒性作用的心血管毒物,能够引起心律失常、缺血性心肌病、心脏肥大、心力衰竭和心肌病等。

(1) 心律失常:化学物质导致的心功能紊乱,主要是对心率、心收缩力、传导性以及兴奋性的影响。

(2) 缺血性心脏病:长时间的缺血会导致心肌梗死,而且血液流通不畅会导致心肌细胞的死亡。心肌梗死造成心脏局部组织永久性损伤,并被瘢痕组织替代。

(3) 心脏肥大和心力衰竭:心脏肥大常常是心脏不断增长的超负荷工作的代偿性反应。在心力衰竭的过程中,心室收缩和协调动作减少从而导致心排血量减少。

(4) 心肌病:药物和化学物质可以导致心肌的疾病。扩张性心肌病形成的原因有进展性心肌肥大、失代偿、心室扩张以及心收缩功能障碍和心收缩功能受损。

2. 心血管毒物对血管的毒性作用

(1) 许多化学物质和药物可以导致血管结构和功能紊乱。人类流行病学研究已经证实,在血管壁损伤与血管疾病如动脉硬化症、高血压的发生率之间存在正相关。动脉硬化症主要是血管壁的改变,它包括平滑肌细胞移行到内膜后形成的局部内膜增厚和不可控制的增殖。动脉粥样硬化的主要结果是动脉内的持续缩小引起远端供血受限。这些改变能导致肾性高血压、脑卒中、心肌缺血和梗死。

(2) 急性中毒时会导致血压的改变。低血压在中枢神经系统(CNS)抑制剂或降压药物中毒以及变态反应中常见。直立性低血压,特别在老年人中,能由治疗药物如降低心排血量或减少血容量的药物所诱发。

(3) 血管收缩剂如血管紧张素Ⅱ和儿茶酚胺浓度升高可能导致高血压,也可以是由于代谢性、肌(源)性或血管(源)性等原因介导的局部调理混乱。血压持续升高也与组织内毛细血管破坏及代偿性血管生成有关,而且持续的高血压也是造成冠状动脉和脑部动脉粥样硬化的重要危险因素。

(4) 动脉和静脉血管在接触毒性物质之后可以造成血栓症。血流突然改变能触发动脉血栓形成，而静脉淤滞可导致静脉血栓发生。可产生血栓栓塞的药物是避孕用的雌激素。

(二) 引起心血管损伤的毒性物质

1. 引起心脏损伤的毒性物质　对心脏损伤的物质有若干种，大体可以归纳为3类，主要是工业试剂、内源性物质和药物。对心脏有毒性作用的工业用品如金属类的镉、铅、钴、钡、镧、镁、镍，溶剂(甲醇、丙酮)以及卤烃类的有四氯化碳、氯仿、乙基溴、乙基氯、二氯二氟甲烷、异丙基氯、甲基溴、甲基氯、丙基氯、三氯乙烷、三氯乙烯、三氯氟烷、三氟溴甲烷；对心脏有毒性作用的天然物质有雄激素如天然雄激素、合成雄激素，雌激素如天然雌激素、合成雌激素和非类固醇类雌激素，黄体酮类的物质；对心脏有毒性作用的药物有抗心律失常药物如丙吡胺、恩卡尼、利多卡因、美西律、醋丁洛尔、艾司洛尔、普萘洛尔、索他洛尔、胺碘酮、溴苄铵、多非利特、地尔硫卓、维拉帕米，影响心肌收缩力的药物如地高辛、洋地黄毒苷、阿地本旦、别嘌醇、多巴胺丁胺、肾上腺素、抗肿瘤药阿霉素，支气管扩张剂沙丁胺醇，抗菌药庆大霉素、卡那霉素、氯霉素，抗病毒药司坦夫定，作用于中枢的药物阿米替林、氯丙嗪，局麻药可卡因、利多卡因等。

2. 引起血管损伤的毒性物质　对血管损伤的物质有若干种，大体可以归纳为3类，主要是工业与环境试剂、有血管毒性的气体和药物。对血管有毒性作用的工业与环境试剂如苯蒽、硼、丁二烯、二硫化碳、甘油、百草枯、氟化氢、多环芳烃类、T-2毒素、氯乙烯及氨基价酰肼等；对血管有毒性作用的气体如一氧化碳、臭氧、汽车尾气、氧化亚氮等；对血管有毒性作用的药物尼古丁、可卡因、环磷酰胺、庆大霉素、氟尿嘧啶、麦角新碱、组胺、四氧嘧啶、氯喹、果糖、华法林、高半胱氨酸、青霉胺等。

(三) 心血管的毒性检测方法

1. 血压检测技术　血压是心血管毒性检测中最常用的指标。一般可分为直接测量和间接测量两种。间接测量方法的准确性主要是由血压计袖带与肢体宽度的比例所确定的，一般情况下不能反映血压的瞬间变化；直接测压很准确，但不足之处是有创伤。

2. 血流检测技术

(1) 测定心输出量的 Fick 法：直接 Fick 法用靛氰绿测定心输出量已使用多年，可以作为其他技术的基础。

(2) 脉冲多普勒流量仪测量血流速度：在血流的测定方面，脉冲多普勒流量仪比电磁流量计测量血流速度要更加精确。

(3) 电磁流量计检测血管血流：目前改进后的新型电磁流量计多使用全自动计算机控制技术进行测量。

(4) 激光扫描仪评价微血管灌注：目前由于计算机技术的发展，使激光扫描仪测量评价微血管灌注比多普勒磁通计更加常用、准确，使用的范围也更加扩大。

3. 容积检测　容积检测多用于测量血管结构的内直径。目前有一种显微检测技术用于微血管的视频分析，其最大的好处是视频剪切可以保持时间的连续性，以记录血管直径的任何瞬间变化。

4. 心电图测定　心电图检测是常规检测项目，它可以反映心脏电活动和功能的信息，但需要专业技术人员研读心电图的报告，且不是十分敏感。

5. 血浆乳酸脱氢酶检测　血浆乳酸脱氢酶(LDH)是细胞损伤的标志物，如果能够检测到LDH，则是心肌严重受损的一个标志，但目前方法的敏感性和心肌的特异性都有待研究。

三、血液毒理学

（一）血液系统的毒性反应

血液毒理学是研究药物、非治疗性化学物及其他外来物在体内对血液和造血组织的毒作用的学科。其研究主要内容如下。

1. *对干细胞的毒性* 有人用CFW小鼠研究急性吸入3次和慢性吸入（半年）苯后CFU-S的变化，证明急性染毒小鼠CFU-S无甚变化，而慢性染毒小鼠CFU-S在2个月后明显下降，并且与外周血白细胞、血小板和血红蛋白的减少趋势相一致，并认为干细胞很可能是苯的靶细胞，苯对干细胞的抑制是造血细胞减少的重要因素。

2. *对微环境的影响* 骨髓造血细胞的微环境好似血细胞的土壤，有人将正常骨髓细胞注入苯暴露的小鼠，结果粒细胞及巨噬细胞克隆均见减少，但正常骨髓细胞与苯处理前的动物培育并不减少克隆的形成，提示苯扰乱了骨髓的微环境。

3. *对粒细胞的毒性* 粒细胞的高度增殖性使它的祖粒细胞对于有丝分裂抑制剂特别敏感。细胞毒药物的这种影响是非特异的，能同时影响粒细胞和单核细胞的物质可引起较严重的毒性结果如感染，且这些反应是有剂量-反应关系的，同时单核巨噬细胞的再生会早于粒细胞。多种细胞损伤物质如抗代谢物（antimetabolites）、氨甲蝶呤（methotrexate）、阿糖胞苷（cytosine arabinoside）可以抑制DNA的合成（有丝分裂环的S相），或G2期（有丝分裂中进行RNA和蛋白质的合成），或M相。烷化物对于积极分裂的细胞是有毒的，在接触后7～14天可以看到最大反应，cytokin通过使细胞分裂进入S相可以提高这些效应。林丹（杀虫剂）与白细胞减少症有关，对于人CFU-GMs有细胞毒性。

4. *对红细胞的毒性* 有些外源性化学物是以细胞为主要靶细胞。大多数化学物对红细胞的毒性是附带的或表现在其他毒性之后，可以影响红细胞的生成、功能和寿命。这些通常可以导致贫血症。

红细胞的生成主要依赖细胞的经常分化和血红蛋白的高度合成率。红细胞细胞质的主要成分是两条α、两条β链。α和β链生长的不平衡是先天性海洋性贫血综合征的主要基础，同时可有血红蛋白生成的减少和小细胞症。外来物可影响血红蛋白链的合成从而改变血红蛋白的组成。

5. *化学物与血红蛋白* 正常红细胞中的高铁血红蛋白含量应少于1%，如超出就可引起高铁血红蛋白血症，许多化学物和治疗性药物均可引起高铁血红蛋白血症。这些物质可被分为直接氧化剂（进入红细胞中就可引起高铁血红蛋白），如亚硝酸盐可直接促进血红蛋白中的亚铁的氧化作用，以及间接氧化剂（体内的代谢产物可产生高铁血红蛋白）。异源型作用包括pH值、2,3-BPG浓度和体温。pH值的降低可减少血红蛋白的亲氧性，引起氧离曲线的右移，促进氧气传输；2,3-BPG与非氧合血红蛋白结合可导致“紧张”状态降低亲氧性，降固醇酸也可降低血红蛋白的亲氧性，类似于2,3-BPG且不损伤红细胞和血红蛋白；当体温上升时血红蛋白的亲氧性降低，如过度运动和发热症状可升高体温从而促进氧向组织的运输，相对应的，体温过低时亲氧性就会升高而降低氧的运输；同时CO也可影响血红蛋白的呼吸功能导致血红蛋白链的“松弛”态的稳定增加亲氧性，使氧离曲线左移，吸烟和矿物燃烧是CO的主要来源。

6. *化学物引起的血小板减少症* 除了先天性血小板减少性紫癜或特发性紫癜以外，血小板减少症往往伴有其他血细胞减少症，很少单纯出现。

血小板减少症的化学病因有苯、铅、砷、碘化钾等化学物及抗肿瘤药物，它主要影响骨髓巨核细胞的生成，骨髓涂片可见巨核细胞明显减少，形态变小。少数物质如噻嗪类利尿剂(thiazide diuretics)、重组 GM－CSF 和甲苄肼(procarbazine)等可引起血小板增多症。能引起血小板功能毒性的毒物有非甾脂类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory agents)、心血管药物、β内酰胺类抗生素、某些化疗药物等。

7. 化学物中毒性白血病与再障　化学中毒性白血病与再障有密切关系，慢性或急性骨髓衰竭可能发展成白血病，这种类型的再障也可能就是白血病前期状态，一些引起再障的因子如苯、丁苯唑酮以及放射线等也可以同样引起白血病。

中毒性白血病是造血组织的增生失调，有骨髓细胞发生改变引起，被分为骨髓性和淋巴性，对应于红细胞、单核细胞、血小板系和淋巴细胞系的改变。临床上将其分为慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性粒细胞性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性粒细胞性白血病(AML)和骨髓发育不良综合征(MDS)。能引起造血功能失调的化学物和放射物均可导致白血病的发生，例如，职业接触苯可引起 AML，这些与细胞基因异常有关，特别是 5 和 7 号染色体部分或全部丢失。

许多用于癌症化疗的烷化物可引起 MDS 和 AML，包括环苯膦、美法仑等。芳香族化合物中只有苯被确定为白血病毒物。接触高剂量 X、γ 射线可引起 ALL、AML、CML。其他毒物还有 1,3－丁二烯、非电离性射线和香烟烟雾。

(二) 引起血液系统毒性的物质

1. 可以产生红细胞毒性的因素　在对红细胞生成的影响因素中，环境因素是其中的主要因素。化学物质如苯可以引起红细胞生成障碍、再生障碍性贫血，有机氯和有机磷中毒可以引起红细胞生成紊乱、再生障碍性贫血，乙醇中毒可以引起巨幼红细胞性改变；电离辐射可以导致急性干细胞损伤，造成骨髓抑制；金属元素如铅可以导致溶血性贫血，金中毒可以导致再生障碍性贫血，砷中毒能够引起一系列红细胞综合征，锌、铜、铝等的中毒可引起铁粒幼红细胞性贫血；药物也会对红细胞造成毒性，干扰素(如 α－IFN)可以引起贫血，普鲁卡因、甲苯多巴可以引起自身溶血病，甲苯氨酯、氢氧化物可以引起再生障碍性贫血。

2. 可以产生白细胞毒性的物质　有丝分裂抑制剂可以影响祖细胞和前体粒细胞，阿糖胞苷、甲氨蝶呤、柔红霉素、环磷酰胺、顺铂和亚硝基脲对静止和分化期细胞有毒性，异丁烯酸甲酯对中性粒细胞和单核细胞有毒性，乙醇、糖皮质激素可损坏粒细胞的吞噬作用及微生物的摄取。

(三) 血液毒理的研究方法

一般实验方法即各种周围血细胞及骨髓细胞的计数和分类，另一些特殊实验方法如下。

1. 体内扩散盒琼脂培养技术　造血细胞在适当的刺激因子作用下，可以在体外琼脂培养条件下逐步生成由粒细胞或单核-巨噬细胞组成的细胞团，即 CFU－C。实际上，刺激因子存在于正常动物体内。体内扩散盒琼脂培养法是将体外琼脂培养技术与体内扩散盒培养方法结合起来一种方法(ADC)。其优点是造血细胞在比较接近于体内条件下生长，生成的细胞团可在显微镜下直接计数，避免了在体外琼脂培养中所必须加入的刺激因子。

2. 外源性脾结节测定法　脾结节是造血干细胞增殖和分化的结果，每一个脾结节中包括含着一个造血干细胞及其增殖和分化的大量幼稚骨细胞和成熟血细胞。同时，受体小鼠脾脏上生成的脾结节与移植的骨髓或脾脏细胞数之间成正比关系。脾结节(CFU－S)测定方法是

研究多向性造血干细胞以及化学毒物或电离辐射对造血干细胞损伤效应的定量研究方法。

3. *骨髓微循环的观察方法* 骨髓微循环是骨髓完成造血功能,输送血细胞所不可缺少的条件,要真正认识骨髓造血及其在化学毒物影响下的变化,观察骨髓微循环是一种很有用的实验方法。

常用的是刮薄骨皮质法,用小刀片将尺骨或腓骨细心刮薄,直至剩下很薄的一层骨皮质及骨内膜,置于有透射光的显微镜下用低倍镜进行观察,骨髓静脉窦的形态,静脉窦的数量,血管的直径及血流速度等。

4. *骨髓铁动力学实验法* 骨髓铁动力学实验是研究化学性贫血有用的方法,骨髓红细胞按照其摄入铁的情况可分为 3 类:①对红细胞生成因子产生反应的红系定向干细胞,它来自多功能干细胞,有分化能力,但不摄入铁;②早幼红细胞中幼红细胞,具有分化能力并摄入铁;③网织红细胞,能摄入铁但没有分化能力。各阶段的时间大致是 24 小时,根据化学物质影响^{59}Fe摄入的时间就可以判断毒作用所在的红细胞类型。

四、皮肤毒理学

皮肤毒理学是研究外来物理、化学和生物因素对皮肤的直接损害以及通过皮肤吸收引起皮肤局部或全身损伤及其毒性作用的机制和防治措施,并对各种皮肤接触的理化因素进行综合评价的科学。

(一) 皮肤毒物的毒性作用

1. *刺激性皮炎* 刺激性皮炎是指外源性物质直接作用的皮肤部位出现的非免疫反应性的炎症,是皮肤接触到强酸、强碱、溶剂及去污剂等化学物质后所产生的一种反应。依据其反应严重程度,可出现充血、水肿、水疱,甚至溃疡等不同表现。原发性刺激症状出现于初次接触的接触部位,因此,它与变态反应不同。

2. *变态反应* 皮肤在初次接触某种化合物时,可能不出现或只出现轻微反应,然而再次接触这种化合物时,可出现严重的反应。其诱导期从几天至几年不等。

再次接触毒物 12～48 小时后可引起反应,故又称之为迟发型变态反应,该反应涉及复杂的免疫机制。简而言之,进入皮肤的毒物与某些细胞的表面结合,进而与 T 淋巴细胞反应。致敏的 T 淋巴细胞再接触到这种毒物时,就会释放出各种生物活性物质,导致充血和水肿的发生。许多化学物,包括体表用药的药物,均可导致变态反应。

3. *光毒性及光变态反应* 这两种皮肤反应具有相似性,都是由光诱导的,并可能通过全身接触或体表接触某些化学物而引起。光变态反应发生与免疫反应有关,而光毒性反应则无此关系。

许多化学物也具有光毒性,又具有光变态反应性。就临床而言,光毒性通常表现为迟发性丘疹和湿疹,但可能表现为速发的荨麻疹性反应,组织学特征为真皮内有大量的血管圆形细胞浸润。迟发性反应是由Ⅳ型 T 淋巴细胞介导的免疫反应,而速发型反应可能是由抗体介导的。

具有生物活性的光是短波紫外线(波长小于 320 nm 的不可见光),可引起皮肤红斑和色素沉着。太阳光波长大于 290 nm,但人工光源能释放波长更短的紫外线。尽管长波紫外线(320～400 nm)本身具有较低的致红斑效应,但与化学物的光毒性和光变态反应有关。

4. *接触性荨麻疹* 某些皮肤反应如荨麻疹、湿疹等在接触到刺激性化合物后几分钟至 1 小时出现,它们与上述的变态反应不同。其机制可能与免疫系统无关,如同阿司匹林和甲基克

酰胺;而某些化学物的作用,如乳胶和青霉素,却与免疫机制有关。在其反应过程中,与 IgE 有关,而非 T 淋巴细胞,这与上述的过敏反应不一样,无论是否有免疫机制参与,皮肤反应都是由作用于血管的物质,如组胺、前列腺素、白三烯和激肽所引起的。

5. 皮肤癌　皮肤癌是人类最常见的癌症之一。皮肤肿瘤有一个特点,无论是良性还是恶性的皮肤肿瘤,一般都源自表皮层,发生于真皮层的较少。

太阳光与皮肤癌相关性的流行病学研究已经证实皮肤癌常发生在户外人群,多见于无覆盖的皮肤;流行病学调查还证实了扫烟囱工人阴囊癌高发,提示煤烟中可能有导致皮肤癌的化学物质;多环芳烃和无机砷还参与了紫外线致癌作用的调控。

6. 化学物对皮肤附属器的影响

(1) 头发:肿瘤化疗中,多种抗有丝分裂剂均能引起头发脱落。这些药物都可影响头发生长初期。头发在用药 2 周内开始脱落。停药 2 个月后,头发才开始生长。

其他一些药物引起头发脱落,是将头发生长期的毛囊转变成生长终止期。这样头发在治疗 24 个月后才开始脱落。

(2) 皮脂腺:这种腺体通过脂肪细胞分泌脂肪故又称全分泌腺。它的分泌受激素的调节,例如雄激素刺激其分泌,而雌激素抑制其分泌,肾上腺皮质类固醇激素和甲状腺激素对皮脂也有刺激作用。

许多氯化芳香烃能引起包括氯痤疮在内的多种皮肤损伤,氯痤疮表现为淡黄色囊泡和黑头粉刺,同时皮脂由角化的囊泡所代替。尽管产生氯痤疮的严重程度不同,但它可见于职业人群。

(3) 汗腺:出汗是具有调节体温作用的重要生理功能。有毒物质可引起汗导管的阻塞,形成痱子。

(二) 引起皮肤损伤的物质

1. 引起刺激性皮炎的物质　强酸、强碱以及不稳定的化学物是引起刺激性皮炎最强的刺激物,仅一次暴露就可以引起不可逆的瘢痕皮炎。直接腐蚀剂、蛋白质溶剂、氧化或还原物质以及脱水剂都可以作为刺激物破坏角蛋白的超微结构或者直接损伤重要的细胞大分子和细胞器。

2. 引起皮肤变态反应　抗生素类的如新霉素,染发剂的成分如 p-次苯肼,局部麻醉药如苯唑卡因,金属类如镍及镍盐、铍、铬盐、有机汞(硫汞散)等,农药类的如克菌丹、乙二胺等,有毒植物如毒常春藤、毒橡树等。

3. 引起光毒性反应和光变态反应　光毒性反应比光变态反应更为常见。人类常见的光毒性化学物有氨基苯酸衍生物、蒽醌、染料、氯丙嗪、酚噻嗪、对氨基苯磺酰胺和煤焦油衍生物(即蒽、吡啶、哎啶和菲等)等物质。发生光毒性反应的皮肤,多表现为迟发性红斑,随后可出现色素沉着和脱屑。

常见的光变态反应化学物包括氨基苯甲酸、氯丙嗪、氯磺丙脲、硫双氯酚、卤化水杨酰苯胺、异丙嗪、对氨基苯磺酰胺、三叠氮化合物等。

4. 引起接触性荨麻疹　可以引起接触性荨麻疹的毒性物质包括金属如铜、铂,药物如抗生素,化妆品和由节肢动物或水母所释放的多聚体物质等。

5. 引起皮肤癌　研究证实,煤烟及其相关物质如煤焦油、杂酚油、页岩油、切削油等能引起人或动物的皮肤癌。另外,砷及砷的化合物与人体皮肤癌有关。

多环芳烃如苯并(a)芘和杂环化合物如苯并(c)吖啶,在动物体表用药后能引起皮肤癌。

紫外线也可以导致人类皮肤癌。

6. 引起皮肤附属器损伤　可以引起头发、皮脂腺及汗腺损伤的毒性物质包括：①容易引起头发脱落的毒性物质，抗肿瘤药物如环磷酰胺，另一些会使头发脱落的药物有口服避孕药、抗凝剂、普萘洛尔（心得安）和三巴唑等。②对皮脂腺有影响的物质，如易引起痤疮的外用药物如油脂、油膏、全身性摄入碘化物、溴化物等；引起氯痤疮的氯化芳香烃如TCDD(2,3,7,8-四氯二苯唑-p-二噁英)等；③对汗腺有影响的毒性物质，如95%的酚和氯仿等。

(三) 皮肤毒性的检测方法

1. 原发刺激实验　原发刺激反应常用兔的皮肤斑贴实验。选择兔的完整和破损皮肤，纱布垫上放置少量化学物贴敷于皮肤脱毛区域。24小时内取下纱布，按皮肤反应程度进行分级评价。于第1～3天再次观察皮肤反应。将试验24小时和72小时的观察结果综合起来，得出原发反应刺激指数。

2. 变态反应　一般用豚鼠进行实验。一侧皮内重复注射化学物10次，停止10～14天后，在另一侧给予激发剂量的药物。与过敏剂量相比给予激发剂量后出现更严重反应，则说明是过敏反应。也有用最大值实验来测试。豚鼠第0天常规给予含或不含弗氏佐剂的测试物。第7天仍在相同位置闭合用药。2周后在相同位置表面用药，在激发中使用不同浓度的药物。

人类体验来自斑贴试验或一定特殊人群之中，后者遂将某物质广泛散发给目标人群，然后对其皮肤反应进行测试和评价。

3. 光毒作用和光变态反应　光毒性很容易在裸鼠、兔和豚鼠中实现。受试物通过敷贴或全身给药，然后观察皮肤对非红斑光线(波长大于320 nm)的反应。与对照组比较，出现明显的红斑认为具有光毒性。

测定光变态反应常用动物为豚鼠。大体上该测试主要程序为在动物脱毛皮肤上反复给予小剂量的某种化合物，然后让此部位接触合适剂量的紫外线，经3周的间隔期后，再次接触该种化学物和紫外线诱导光变态反应。

4. 接触性荨麻疹　现已建立了许多动物模型，如在豚鼠的腹侧和乳头处进行斑贴实验。近来应用豚鼠耳部测试，已能很好地筛检引起人类接触性皮炎的物质。开放性斑贴试验适用于志愿者或可能对某物质敏感的患者，对后者必须配备有复苏和能处理变态反应的专业人员。

是否有免疫机制参与可采用被动转运试验来测定，即给志愿者前臂皮下注入来自病人的0.1 ml新鲜血清，24小时后在注射部位给予可疑物质进行激发。

5. 皮肤癌　其步骤是在脱毛皮肤表面给予某种化合物。若毒物本身为液态则可直接运用，否则应以适当的载体制成溶液或悬浮液。皮肤涂抹一般是1周一次或多次。常用动物为小鼠。不仅要用已知皮肤致癌物如苯并(a)芘作阳性对照，也应设立溶剂作对照组。

6. 体外测试　体外测试是为了减少使用整体动物数量，包括采用正常人角朊细胞对中性红的摄取试验。如果化学物能破坏这些离体细胞，则能减少这种色素的摄取。也有用培养的大鼠表皮角朊细胞来测试化合物对浆膜的完整性、溶酶体和线粒体功能等毒效应的体外实验研究。

（唐　萌）

第九章　毒理学安全性评价、健康危险度评定和危险管理

化学物的毒理学安全性评价和健康危险度评定是管理毒理学的主要内容之一。化学物的毒理学安全性评价是通过规定的毒性测试程序和方法，评价化学物的毒性，为提出可被社会接受的机体暴露剂量提供科学依据。健康危险度评定主要通过危害识别、剂量-反应关系分析、暴露评定和危险特征分析等步骤，评价化学物在一定的暴露条件下所产生的不良效应的概率。化学物的毒理学安全性评价主要用于对新化学品或新产品如新药、新食品添加剂、农药等在其进入市场前进行安全性论证，从而决定是否容许其投放市场，或阐明安全使用的条件，目的是最大限度地减少危害，保护人民的身体健康。健康危险度评定主要评价现有化学物所存在的对特定人群产生不良健康效应的概率，提供决策者是否需要降低或减少该危险度的科学依据。化学物的毒理学安全性评价和健康危险度评定是描述毒理学和机制毒理学的原理和方法在实际的应用，是化学物管理的主要依据。

继健康危险度评定之后，危险管理和危险交流也是管理毒理学的重要内容。危险管理主要依据所需管理化学物的使用目的，及分析评定所得到的其对使用人群和相应环境是否具有充分低的危险数据，由政府管理部门制定相应法律法规，提出解决问题的措施，并实施和执行这些法律、法规和措施：决定其能否进入市场；提供化学物的环境排放标准及工作场所的职业接触限值；对化学物的废弃场所及污染地污染源等提出管理措施等。由于危险管理涉及多个方面如技术、经济、行政、社会文化、群众心理、舆论、政策法令等一系列问题，并且在实施时需要制订消减危险的计划，所以政府、管理机构、消费者、公众需要进行危险信息交流，相互沟通信息，积极投入才能收效。

第一节　化学物的毒理学安全性评价

化学物的毒理学安全性评价有一定的规范和原则，根据受试化学物的不同使用方式、暴露途径和程度，其相应的毒理学安全性评价的标准程序、评价项目、实验类型和实验方法也有所侧重。

一、化学物的毒理学安全性评价的主要内容

化学物的毒理学安全性评价方法，通常需要根据化学物的种类和用途，根据国家标准、部

委和各级政府发布的法规、规定或行业规范中的相应程序来选择。

(一) 资料收集

在决定受试化学物并开始进行毒理学安全性评价时,首先要收集以下资料。

1. *理化特性* 化学结构式,纯度,杂质含量,沸点,蒸气压,溶解性以及类似物的毒性等。资料主要来自文献(包括文字资料及电子信息网络检索资料)、化学产品资料,以及必要的实验室资料。

2. *使用方式与用量* 通过文字资料及现场考察,了解暴露方式(是否在制造、加工、运输、使用、废弃物处理、残留等过程中接触人体),并估计进入人体的可能途径、剂量与作业及生活环境的污染范围和程度。

3. *环境浓度与转归* 估测环境有关空间浓度及随后降解、蓄积和残留情况,并提出生态毒理学研究方向。

通过以上这些资料的收集,可以先利用化学结构式预测化学物的毒性特征;在进行毒性实验时通过受试物用量和环境中的浓度估计来选择染毒剂量;通过受试物理化特性和使用方式等选择染毒实验种类。这些资料的收集既是化学物的毒理学安全性评价的内容,也是进一步进行毒理学实验的基础。

(二) 毒性实验

主要通过整体动物实验和体外测试,来识别和估测化学物对人的毒作用,并推导出人的安全暴露水平。按研究的深度,可分为以下 4 个阶段。

1. *短期实验* 短期实验包括急性经口毒性实验、急性经皮毒性实验、急性吸入毒性实验、急性眼刺激性/腐蚀性实验、皮肤刺激性/腐蚀性实验、皮肤变态反应实验(皮肤致敏试验)。实验一般要求用两种动物,染毒途径模拟人体可能的所有暴露途径,测试获得经口、经皮或者经呼吸道的 LD_{50} 或 LC_{50},目的是提供受试化学物的急性毒性基本资料(包括毒作用的剂量范围、毒作用表现,大致毒作用性质、特点及推测靶器官),为其他试验的剂量设计提供参考。此外,在管理毒理学上,还可提供急性毒性分级资料,用于化学物的警戒标记。一般认为,新化学物的经口、经皮暴露,$LD_{50} > 5\,000$ mg/kg 体重,吸入暴露,$LC_{50} > 5\,000$ mg/m^3,且无其他潜在危害征象者,可不考虑作更高剂量的毒理学实验,但并不排除投入使用后的人群观察研究。

2. *体外遗传毒性实验和亚急性或重复剂量毒性实验* 体外遗传毒性实验包括鼠伤寒沙门菌回复突变实验、体外哺乳动物细胞染色体畸变实验、体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变实验、体内哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变实验、精子畸形实验、啮齿类动物显性致死实验等,亚急性或重复剂量毒性实验包括亚急性经口(28 天)毒性实验、亚急性经皮(21/28 天)毒性实验和亚急性吸入(14/28 天)毒性实验等。这一阶段实验的目的主要是了解受试样品的亚急性毒性和遗传毒性,为进一步的各项实验的剂量设计和观察指标的选择提供依据,并对受试样品的致癌性进行预测。致突变实验需要几个实验成组使用,以观察不同的遗传学终点,提高预测遗传危害和致癌危害的可靠性。尽管阳性遗传毒性检测结果未必能作为致癌的直接评价指标,但仍可作为慢性毒性实验的筛检指标。明确具有诱变性的化学物,应被视为可疑的遗传毒致癌物,并作进一步的研究。根据需要还需进行代谢和药物动力学实验。

3. *亚慢性毒性实验、致畸实验和繁殖实验* 这一阶段的实验主要包括亚慢性经口毒性实验、亚慢性吸入毒性实验、亚慢性经皮毒性实验、致畸实验、两代繁殖毒性实验和迟发性神经毒

性实验。这一阶段实验常要求同时使用啮齿类(如大鼠)和非啮齿类动物(如犬),经过较长时间(实验动物寿命的 1/10),反复给予较低剂量的化学物,观察化学物对机体的某些非致死性毒性指标,如功能、生化、生理及病理效应。实验目的是进一步确定多次重复染毒的毒作用性质和靶器官,以及是否有可逆性;描绘剂量-反应(效应)曲线类型,寻求亚慢性毒性的观察到损害效应最低水平(lowest observed adverse effect level, LOAEL)和未观察到有害效应的水平(no observed adverse effect level, NOAEL),为制订安全暴露水平和进一步进行慢性实验提供依据。致畸实验适用于任何新化学物,特别是在化学结构上与已知致畸物相似的物质。通过致畸实验判断受试样品的发育毒性,常在妊娠动物处于主要器官形成期给药,直接评价化学物引起胎儿结构缺陷的潜在作用。繁殖实验则侧重于评价受试样品对性腺、生育力、妊娠、胎儿、泌乳和一般生殖功能的不良作用。通过迟发性神经毒性实验还可判断受试样品的迟发性神经毒性。

4. *慢性毒性实验和致癌实验*　这一阶段实验包括慢性经口毒性实验、慢性吸入毒性实验、慢性经皮毒性实验、致癌实验或慢性毒性实验合并致癌实验、毒物代谢动力学实验等。这一阶段的实验目的是确定受试样品慢性毒性的 NOAEL 和 LOAEL,为制订安全暴露限值提供依据。凡是在亚慢性实验中提示损害可随暴露时间延长而加剧,且有明显的蓄积作用者,应考虑做慢性毒性实验。一般染毒时间在 1.5～2 年以上。根据亚慢性实验所得的信息,选择敏感特异指标,定期观察,以判断其慢性作用特点,确定人类长期暴露和动物慢性毒性实验之间的安全界限,为制定卫生标准提供依据。凡化学结构与已知致癌物相似,遗传毒性测试结果多数阳性,或对特殊器官有明显蓄积作用者,应考虑做整体动物致癌性实验,一般进行大鼠的终生实验。有时可结合慢性实验进行。毒物代谢动力学实验着重探究机体对毒物的吸收、分布、代谢和转化,以及与体内大分子化合物的相互作用及排泄特点,了解蓄积毒性作用等。毒物代谢动力学实验有助于阐明化学物的毒作用机制,并估测其潜在危害。例如,氯乙烯诱发大鼠肝脏血管肉瘤的发生率是与氯乙烯在体内的代谢产物量,而不是和母体化合物的暴露量成比例。

除以上这些毒性实验,还有一些参考实验,并可视需要进行一些特殊研究,如进行靶器官毒理学研究等。

毒理学安全性评价遵循分阶段实验的原则,急性毒性实验是所有毒理学实验的基础,LD_{50}数值是亚慢性毒性实验、致畸实验和某些致突变实验剂量设计的参考依据之一。急性毒性的分级依据,主要依靠 LD_{50} 数值的大小,但还需综合考虑化学物毒作用的靶器官、损伤机制、可逆性、后遗损害及联合毒性作用等。例如,二氧化硅粉尘的急性毒性很小,但一次较大剂量吸入后的后遗作用仍有可能很严重;除草剂百草枯的经口吸入与经皮的 LD_{50} 数值均较高,但是有严重的持续进展与不可逆性肺肉芽肿损害,后果可能致死。所以对于类似这些有严重不可逆后遗作用化学物的判断,仅依此 LD_{50} 或 LC_{50} 分类分级尚有不足。慢性毒性实验各组剂量和观察指标的选择要参考亚慢性毒性实验的结果。为尽量减少人力、物力、财力的消耗,对于实验周期短、费用低、预测价值高的实验予以优先安排。根据每一阶段的实验结果,分析是否需要进行下一阶段的实验。如某些待评的化学物,在进行了部分毒理学实验后,即可对其作出评价;而另一些物质在某个阶段的实验中表现出很强的毒性,即可将其放弃,而不必进行以后阶段的实验。

化学物毒理学安全性评价指标的取舍决定于:①受试动物的毒作用特点;②各种实验所得结果;③所得资料是否已足以作出评价。最后,综合化学物的理化特性,以及环境、社会、经济及技术等客观情况,作出决策性评定,供有关部门参考。

（三）人群暴露资料、健康监护和随访

化学物毒理学安全性评价的最终目的是保证人类的健康。由于实验动物和人之间，实验条件和人群暴露受试物的实际情况之间存在许多不同，因而上述毒理学实验的评价结果外推到人时有很多不确定性。然而，人群暴露资料可直接反应受试物对人的效应，一旦确定，具有决定性意义。因此，应尽可能地收集人群暴露资料，包括对志愿者的试验和检测等。

在化学物进入市场后，要进行暴露者的健康监护和随访，观察暴露者的健康状况，以验证毒理学实验结果。进一步在化学物毒理学安全性评价的基础上，评估实际暴露情况下的化学物危险度，提出危险度管理的定量限值及依据。

二、评定结果的解释

化学物毒理学安全性评价是预示化学物对人的潜在危害，确保该化学物使用安全的重要手段。但是，由于存在种属及实验设计等方面的种种差异，如何解释毒理学测试结果，并将其推导及人，仍然是安全评价中所存在的局限性，应予认真对待，恰当解决。

1. *易感性差异* 无论是一般毒性或遗传毒性效应，种属间易感性差异都是显而易见的。为安全起见，在无确切的资料情况下，常把人视为最易感的种属，以最易感动物实验所得LOAEL或NOAEL除以安全系数（safety factor）或不确定系数（uncertainty factor，UF）作为人的安全暴露限值。目前尚无推断安全系数的客观和定量指标。

2. *低剂量推导* 一般说来，在一定剂量范围内毒物对哺乳类动物的毒作用机制及表现接近于对人的作用。因此，在此剂量下将动物实验结果定性地外推及人较为一致。反之，如将高剂量实验结果定量地外推及人，用以预示对人的低剂量效应，则可能由于大剂量毒物，改变了代谢途径，使其预示性出现偏差。

3. *实验动物样本大小* 动物实验结果中的假阴性，随实验动物的减少而增高。此外，还可由于暴露条件、实验期限，以及剂量表达方式不同，造成其他一些不确定因素。

在化学物毒理学安全性评价过程中，同样要强调微观实验手段与宏观的现场调查和人群观察的结合，避免高估或低估毒理学实验的结果。

三、评价过程中的注意事项

毒理学安全性评价的程序和要求，按照不同的化学物、不同的用途，有不同的要求，评价程序要求和方法有着国家标准。中华人民共和国国家标准均已在网上公布。各国和各行政机构的标准内容基本相近，并正在逐步协调和接轨。

为保证毒理学安全性评价的结果准确，必须对研究的全过程进行质量控制和保证，这是实现与国际接轨、并和国内外实验室之间数据通用的基础。目前，优良实验室规范（Good Laboratory Practice，GLP）已被广泛接受，GLP涉及实验的一般标准，如对实验环境清洁程度、动物饲养处理要求、实验结果的完整和保存等。因此进行毒理学安全性评价必须全面贯彻执行GLP，从而保证实验结果可靠。

第二节 健康危险度评定

危险度评定（risk assessment），也可被译为风险评定。对化学物的危险度评价主要包括

对健康的危险度评定，即健康危险度评定，以及对生态环境的危险度评定。

1983 年，美国 NRC(National Research Council)详细阐述了健康危险度评定的程序。健康危险度评定的内容可分为 4 个部分，即危害识别(hazard identification)、剂量-反应评价(dose-response assessment)、人群暴露评估(human exposure assessment)和危害特征分析(risk characterization)。最后，基于这 4 个步骤的评价结果，提出危险管理对策(risk management)，将“微观”的科学转化为“宏观”的危害控制决策与行动。NRC 进一步又增加了科学研究和健康危险度评价双向反馈的结构框架，使毒理学、流行病学、暴露评价、基于生物学的有害效应模型、变异和不确定模型以及迅速发展的基因组学等领域的研究进展有机结合，对促进健康危险度评价产生巨大的贡献。

一、危害识别

危害识别是定性危险度评定，其目的在于确定某种化学物暴露后所产生的健康结局。它是定性评价化学物对暴露人群发生有害作用的可能性。主要运用以下研究进行评价：结构-活性关系分析；毒性实验，包括体外和短期毒性实验，还有体内动物实验(毒性实验方法和安全性评价中的毒性实验方法基本相同)；来自流行病学研究的资料。

(一) 结构-活性关系

在危害识别中，化学物的结构、可溶性、酸碱度、亲电子性、挥发性和化学反应，都是非常重要的信息。如职业致癌剂有许多属于芳香族胺类化学物，N-亚硝基、氨基偶氮等结构与致癌活性有着密切的关联，因此具有这些结构的化学物需要增加是否属于潜在的致癌物的评价内容。另外，对于一些含有丙戊酸类维生素 A 酸或乙二醇醚结构的化学物需要评价它们是否有生殖发育毒性。结构-活性关系还被用于对混合物的危险度评定，最典型的例子是美国 EPA 根据化学物对芳香族受体的诱导特性，利用毒性当量来评价二噁英，相关的氯化、溴化同系物，以及多氯联苯等的毒性。但是，对于混合物有多个毒性终点的情况下，运用单一的生物学反应评价估测其毒性活性尚比较困难，必须增加多种指标进行综合评价。结构-活性关系在化学物的形成过程中具有重要的作用。药物、农药等的设计发展有很大部分基于结构-活性关系。因此，了解结构-活性关系在评价化学物的毒性作用中有着不可忽视的作用。

(二) 体外和短期实验

体外和短期实验可提供化学物的效应机制信息，实验周期短，花费少。实验包括遗传毒性实验，生殖发育毒性实验，神经毒性实验，免疫毒性实验等。体外实验的数据不能作为预测对人危险性的唯一资料来源。确认化学物的体外短期实验结果的敏感性和特异性，预测毒性终点，这对化学物的危险评价有着重要和实际的意义。

(三) 动物实验

在危害识别中动物实验数据是最主要的组成部分。动物实验有急性、亚慢性、慢性毒性实验，致畸、致癌、致突变实验等，其中长期慢性实验对于致癌物的评价非常重要。和化学物安全评价相同，动物实验必须考虑合适的动物品系、性别、剂量、暴露途径和足够的样本数。由于可以人为地控制实验条件和各种混杂因素，动物实验结果可以较确切地反映各种特定暴露条件下所产生的特定健康效应，因果关系明确。对于致癌化学物危险性评估的基本前提是导致动物产生肿瘤的化学物也能导致人类的肿瘤，虽然这种关联并非一定存在，但是在缺乏足够的人的数据时，采纳这个前提的根据是预防性原则。

（四）流行病学资料

流行病学研究可以提供暴露与疾病之间的相关。由于不需要实验结果的外推，流行病学资料可以为危害识别和数据特征提供非常有用的信息，是人类危险性评价中最可信的证据。流行病学调查中经常使用的研究类型为横断面调查、病例对照研究和队列研究可结合进行，如在队列研究内进行病例对照研究。在对化学物危害识别中，论证强度最优的是队列研究，其次为病例对照研究，再次为横断面研究。对人类许多化学致癌物的认识主要源于对职业流行病学资料的研究。由于职业流行病学调查对象是职业人群，与一般流行病学研究相比具有以下特点：①研究人群相对稳定，可以通过就业记录收集职业史资料；②职业暴露比较明确，强度（浓度）较高，有利于发现、确定暴露反应关系；③职业人群健康监护，包括就业前体检，定期体检、退休体检等，可提供连贯的健康状况资料。但是，流行病学资料是有局限性的。对在临床症状出现前的潜伏状态下所得数据的评价常常是粗糙的和回顾性的。在长期的暴露过程中，常常会有多重暴露。一些生活方式因素如抽烟和饮食常常影响着结果。人类遗传性多态可能造成对化学物的敏感性不同。因此，在危害识别中要结合各方资料作出综合判断。

化学物的危害识别在通过资料判断毒物危害的性质外，还可根据其他医学生物学的研究结果，汇集现有资料，综合评价其质量，权衡后作出取舍或有所侧重，特别要注意对人体的作用与影响。在许多情况下，这项评判并不是仅作出是与非或黑与白的结论，还必须分级分类。

二、剂量-反应评价

剂量-反应评价用于定量危险度评定，即评价确定外源化学物剂量与有害效应发生频率（群体效应率）之间的关系。剂量指化学物进入体内或到达靶组织的量（暴露水平），而效应指标一般选择在重要的暴露途径下，在最低暴露水平所发生的，对最敏感生物产生的关键不良效应。剂量-反应评价通过测定不同暴露水平的有害因素与暴露群体有害效应发生率之间的定量关系，制定健康危险度评定的定量评价数据。

一般从人群的暴露预测有害因素的效应的数据是非常有限的，因此动物实验成为大多数健康危险度评价的基础，然后外推至人类的健康危险度评定。值得注意的是，人类常常长期暴露在比动物实验所观察到的效应范围更低的环境水平下，因此从高剂量到低剂量的延伸及从动物到人类的延伸是健康危险度评定的一个主要组成部分。

（一）有阈值效应的剂量-反应评价

非致癌毒性的健康危险度评定和致癌毒性的健康危险度评定，所用指标有所不同。非致癌化学物作用于机体产生一般的毒效应，如引起生理生化过程的异常改变、病理组织学的变化，只有达到某一剂量水平时才能发生，因此引起这些毒效应产生的化学物剂量有一个阈值。这些毒效应属于有阈值效应。许多化学物作用于生殖细胞、胚胎或胎儿，导致细胞死亡、生物合成减少、分化程度改变、形态发育障碍，胚胎死亡、生长迟缓、畸形和功能不全，也显示出有阈值剂量的存在。剂量-反应评价的一个重要任务是测知阈剂量或阈下剂量。测定指标主要是确定没有观察到有害效应的剂量水平 NOAEL，或观察到有害效应的最低剂量水平 LOAEL。NOAEL 传统上作为健康危险度评价统计的基础，用于估算安全参考剂量：

$$安全参考剂量 = \frac{\mathrm{NOAEL}}{\mathrm{UF}} \times \mathrm{MF}$$

其中，UF为不确定系数(uncertainty factor)，MF为修正因子(modifying factor)。不确定系数是把实验动物的NOAEL或LOAEL缩小一定倍数来校正误差。这些不确定系数的内涵主要有以下几个方面：实验动物和人的差异，一般人对于多数化学物的毒性反应要比动物敏感，实验动物和人在药代动力学和药效动力学两方面有很大的差异；人群中个体敏感性的变异；从亚慢性毒性试验资料推导慢性毒性试验，会产生结果的不确定性；在一些实验数据中不能发现NOAEL，通常在使用LOAEL外推参考剂量时，从LOAEL到NOAEL有不确定性；还要考虑到有限的实验动物数和有限的实验结果不能充分阐述各种可能的不良效应。这些不确定性每个可取不确定系数最大为10。在实际运用中必须综合各个数据资料，由专家来判断总的不确定系数。同时，需要根据专业知识考虑研究的科学性以及上面各项未能包括的不确定因素，如存在作用机制方面的不确定因素、待测物质所致实验动物的损害作用是否与人类相似等。当这种不确定性在上述的外推中未得到解决时，需要乘以修饰系数MF，MF一般大于0小于10，当研究中的不确定因素可由UF予以充分估计时，MF取值为1。

安全参考剂量的指标名称，各国并不一致。加拿大卫生部采用的是可耐受的每日摄入量/浓度(tolerable daily intake/concentration, TDI/TDC)，国际化学品安全司(IPCS/WHO)采用的是耐受摄入量(tolerable intake, TI)，美国毒物与疾病登记署(ATSDR)采用的是最小危险水平(minimum risk level, MRL)；美国环境保护署采用的是参考剂量(reference dose, RfD)或参考浓度(reference concentration, RfC)；世界卫生组织采用的是可接受的每日摄入量(acceptable daily intake, ADI)。这些指标的概念是人群终生暴露于该水平，预期发生非致癌或非致突变有害效应的危险度可低至忽略不计的程度。

在以上这些安全参考剂量的制定中，可看到关键效应的NOAEL通常被用作安全参考剂量的起始点值。但是，NOAEL有着明显的不足，它是实验过程中一个点的数据，未考虑到剂量-反应关系曲线的斜率，并高度依赖于实验剂量的选择和样本数量的大小，因此不同的实验可能产生不同的NOAEL，有着可比性方面的问题，也不能确定高于参考剂量所发生的风险。因此，越来越多的组织机构通过数学模拟方法来估计参考剂量的起点值。基准剂量(benchmark dose, BMD)法目前被较广泛应用。BMD法是由美国Crump 1984年最先提出，他认为传统制定RfD的方法，虽然被使用了许多年，但对于其中NOAEL的界定并没有总的指导方针或者规则，特别是当对照组发生自然损害时NOAEL的制定更加不确定。于是，他提出了一种新的制定RfD的方法——BMD法，BMD被定义为使化学物有害效应的反应率升高到某一特定水平所需要的剂量，这一特定水平通常为比人类背景发生率高出1%～10%。以BMD的95%可信区间下限(Lower Confidence Limit of the Benchmark Dose, BMDL)代替NOAEL或最小损害作用剂量LOAEL。BMD提出至今已在发育毒性研究、神经毒性研究和内分泌系统研究上得到了广泛的应用。美国环境保护局(EPA)建议将BMD这一方法应用到生殖毒性研究中，发行了使用指导方针手册，并于2000年开发了BMD计算机软件和BMD应用指南，统一了BMD的使用方法，使之便于推广和应用。BMD方法在制定非致癌物的可接受的人类暴露水平时比传统方法更合理，可弥补NOAEL的不足。

目前还有一些新的分析模型方法正在不断开发完善中，如分类回归法、概率参考剂量法等。由于危险度评定中有许多不确定因素及资料空缺，许多时候就不得不以假设来弥补，假设与真实之间的出入就可能造成危险度评定结果有很大的波动幅度。

(二) 无阈值效应的剂量-反应评价

对于致癌毒性和致突变毒性，一般认为在零以上的任何剂量均可发生。评价致癌物最早

也是最安全和保守的方法是完全禁止该物质的生产和向环境中释放，该方法可用于部分人造化学致癌物的危险性管理，但是对于许多天然环境中存在的一些致癌物就不适用。由于毒理学实验研究不能直接测定 NOAEL 以下剂量范围内的剂量-反应关系，因此在评价化学物的致癌毒性和致突变毒性时，需要从低剂量反应向低于生物学观察范围和低于阈值反应范围外推，目前主要是通过数学外推模型来估算，因此发展拟合度高的数学模型将有利于得出较好的外推结果。数学模型目前主要有：①概率分布模型(probability distribution models)，此模型主要的假设基础是每一个体均对被试化学物有一定的耐受能力，但是个体间耐受能力是有差异的，导致反应水平根据特定的分布概率函数而不同。拟合这些反应可用累计剂量-反应函数。②机制模型(mechanistic models)，此模型的依据用可能的生物学反应机制来设计数学的剂量-反应关系，假设反应(毒性效应)来自于一个特定单位的毒物剂量，将形成随机发生一个或几个生物学事件，在一定的剂量上形成充分的事件发生，最后造成主要的靶改变，因此在低剂量反应曲线中，毒物剂量和生物学事件发生成线性比。还有一些模型包括基于生理学毒代动力学模型(PBTK)，该模型不仅考虑暴露剂量，还使用实验动物与人的器官血流量、组织容积等生理学参数、化学物在不同组织脏器中的分配系数以及生物转化和代谢资料，通过计算靶组织中的剂量及代谢活化产物的数量，找出剂量-反应关系。但在模型中增加使用的参数，在一定程度上限制了它的推广使用。③基于生物基础的剂量反应模型(biologically based dose-response models, BBDR)，该模型结合了毒性反应中特殊的生物学过程参数，如受体结合水平，酶的代谢活性，细胞周期变化等，使一般的机制模型更明确地反映特定的生物学过程，以便更好地确定靶剂量与毒效应之间的定量关系。④时间-肿瘤反应模型(time-to-tumor response model)。但是，目前尚无一个经过验证的外推模型。致癌效应化学物的剂量-反应评定可用相对保守的模型，选取未观察到致癌效应的剂量除以一定的不确定性系数，求得人群暴露危险性的参考剂量，因为该方法简单、明了，而且用该方法提出的安全性或危险性的概念易于被大众所理解及接受。由于针对的是致癌效应，故不确定系数可放大到 10^{-6}。

三、暴露评估

暴露评估是针对所评价化学物(外来因子)，通过分析其来源、类型、机体的暴露量及暴露时间，从而计算和确定进入机体或到达靶组织点的量和浓度。暴露评估是健康危险度评价中极其重要的一环，也常常是非常不确定的一环，因为暴露评估最需要的是确定到达靶组织的毒性形态的化学物的量而不仅仅是整个暴露量和暴露类型。

(一) 暴露途径

要明确化学物的暴露途径，首先要确定化学物的来源、类型，要明确化学物在职业和生活环境中的数量，在空气、水、土壤、食品和人体中的分布转运和转化情况。在作暴露评估时，既要评价包括职业场所的直接暴露，又要包括大气、水与食物(甚至药物)中污染物的间接暴露，即需要评价职业暴露和生活环境的暴露。要确定这些暴露进入机体的主要途径，如在职业环境中可能吸入为主，而在生活环境中可能是食入为主。要分析这些化学物在不同环境介质中的分布，重要环境介质的贡献；要分析不同暴露途径的贡献。

(二) 暴露量

暴露量的计算：暴露的持续时间(duration)、浓度(concentration)和频率(frequency)等参数可以作为暴露指数使用。暴露量可以统计为[介质中化学物的浓度×摄取率×暴露频率×

暴露持续时间/(身体体重×平均时间)]。式中这些变量可以是一个分布变量,也可以是一个点的估计。通过分布变量统计,可以估算95%的上、下限值。通常,暴露浓度随时间、空间而变化。测量的这些变量数据分布如果接近于对数正态分布时,常用几何均数(GM)和几何标准差(GSD)描述数据的集中水平和离散程度。

(三) 暴露评估的复杂性

在确定暴露量时,除了要考虑环境介质和暴露途径的贡献率,还要考虑暴露人群的年龄、性别、数量、分组和其他特征,如营养状况、吸烟等有关影响的因素,及遗传背景差异等易感性因素。在暴露评估中要描述在评估过程中所有的不确定因素,及其评估结果的波动范围及可信性(reliability)等。暴露的持续时间、浓度和频率等指标的应用取决于研究对象的作用性质。有些毒效应如发育毒性,单一剂量就可产生不良效应。在有些情况下,暴露并非是整个生命周期中都存在的,如职业暴露,必须了解短期的高水平暴露。在这些情况下,急性效应用短时间内浓度作为暴露指数,用每天暴露量更合适。长期效应则用累计暴露量表示较为合适。累计暴露量是常用指标之一,它兼顾了不同时限的暴露水平和暴露时限的长短。某些效应,统计近期如一月或半年的累计暴露量更有意义。暴露的持续时间是根据暴露时间长短来划分,不考虑实际暴露水平的变化。在量化过程中必须考虑环境中的有害物的浓度波动,求得代表性数据。

(四) 暴露评估方法

在暴露评估的实际操作时,可以采取:①通过调查表了解有无暴露、暴露持续时间、暴露频率以及暴露方式;②通过环境监测对作业和生活环境进行有计划地系统地检测,分析环境中有害因素的性质、强度、在时间空间的分布及消长规律,并通过个体环境监测分析人的暴露状况;③通过生物监测定期、系统和连续地检测人体生物材料中毒物和(或)代谢产物的含量或由其所致的效应水平。个体和群体的环境监测,由于涉及摄入、体内分布、生物转化、贮存、降解及排泄诸多过程,且各物种、品系、个体及器官组织的生物利用度又有不同,所以要从外暴露水平推算靶剂量就有许多的不肯定因素,数据存在许多不确定性。生物监测则可以较好地反映人体的暴露水平。

四、危害特征分析

危害特征分析是提供所评价化学物对健康产生有害作用的可能性估计,是分析和综合由危害识别、剂量-反应关系评价,及暴露评估而来的数据、信息及结论,给予政府和管理层关键的发现和信息,从而可以应用于公共卫生决策。危害特征描述的主要内容有:①说明什么是有害效应的实际及估算发生率;②说明证据的充分和有效性;③说明评价的确定性;④说明人群的易感性;⑤说明所评价化学物的作用模式。为说明以上问题,在危害特征描述时,要解释评价方法的应用,如定性还是定量方法,用哪些指标来描述等;并解释在对所收集到的毒理学和流行病学资料进行总结和分析时所考虑的不确定性,如分析整个评价过程中的剂量高低及外推、年龄、性别、健康因素和遗传背景等因素,并分析不确定性因素的性质和大小;最后说明得出健康危险度评定结果,比如求出某一人群可能遭受的超额危险度的估测值,或暴露某化学物可造成的超额癌症发病或死亡为一百万分之多少个人等。危害特征所描述的化学物健康危险度、结论的关键性支持信息和分析方法的性质、各个阶段中的假设和不确定性以及危险性评价的质量和可信度及资料的局限性,目的在于向决策者和管理人员提供危险性管理时的科

学依据。

五、案例分析

下面通过对金属镉的健康危险度评定案例阐述健康危险度评定的实际运用。

(一) 镉的危害识别

由以往的资料统计,动物实验和流行病学调查等表明:金属镉是一种在工业中广泛应用的重金属元素,目前全世界镉的年产量约为 17 000 吨,主要被用于电镀、油漆、颜料、电池、照相材料和陶瓷等行业。在我国,镉的污染较重而且区域较广,每年由工业废弃物排放到环境中的镉总量约 680 余吨,已报道的镉污染区有 20 余处。20 世纪 30 年代初发生在日本神通川流域的"痛痛病"事件表明工业污染造成的环境污染会对居民的健康带来极大危害。镉可以通过呼吸道、消化道等途径进入体内并引起人体多器官和系统的损害,如肾脏、骨骼和生殖系统的损伤。动物实验也显示镉能引起肾脏损害,睾丸肿瘤等。近年来研究证明,无论是从毒性还是蓄积作用来看,镉都是在汞、铅之后污染人类环境、威胁人类健康的第三个金属元素,因而镉的生物学效应再一次受到重视。1993 年国际癌症研究机构(IARC)将镉列为人类致癌物。联合国环境规划署(DNFP)和国际职业卫生重金属委员会也把镉列入重点研究的环境污染物,WHO 则将其列为优先研究的食品污染物。从 1997 年到 2001 年,美国毒物与疾病管理署(ATSDR)一直将镉列为第七位危害人体健康的有毒物质。

(二) 镉引起的肾脏功能损伤的剂量-效应评价

镉的毒效应可用不同的靶器官效应作观察终点,诸如肾脏、骨、和前列腺等。肾脏是镉慢性毒作用的主要靶器官。镉暴露的剂量取决于镉从职业暴露与环境暴露中摄入的数量。镉的暴露生物标志可选血镉、尿镉等。血镉可以正确衡量体内镉含量,但由于有创伤性,在现场调查中不适合大量人群的调查;尿镉反映了体内镉的蓄积水平,本次案例中选取尿镉评价剂量-反应关系。镉对肾损害的效应生物标志有两类;一是反映肾小管功能改变的指标如 β_2 微球蛋白(UBMG)、尿 N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)和视黄醇结合蛋白;另一类是反映肾小球功能改变的指标,如尿白蛋白。所有指标均用肌酐校正。

分析结果表明,在高污染区总体、男性和女性居民中,肾功能损伤指标均高于对照组居民的指标值。同为肾小管损伤的指标,UNAG 出现变化比 UBMG 早。取对照组的 90%上限为 UBMG、UNAG 和 UALB 的正常值上限,分析显示不同暴露指标与肾功能异常指标之间都存在正相关,在统计学上有显著性意义。尿 NAG 同工酶的阳性率基本随尿镉的排泄增加而升高。尤以 NAG-B 及总酶明显,当尿镉为 2 μg/gCr 时,尿 NAG-B 的阳性率就超过了 10%。

基准剂量分析:首先需要确定化学物与所产生的效应间的剂量-效应关系,然后计算出基准剂量,推算出基准剂量的 95%低限水平(LBMD)。按照效应指标以对照区人群的 90%上限为正常值上限,求得不同暴露剂量时各效应指标的异常发生率;尿镉作为暴露标志物与各效应指标异常发生率均有剂量反应关系。取肾功能损害的额外发病风险率为 5%,即基准反应(benchmark response)为 5%,分别计算镉暴露(尿镉)引起的肾功能损害的基准剂量,推算出 LBMD。图 9-1 显示了尿镉与各个肾功能损伤指标之间的剂量-反应关系。表 9-1 显示了用 $\ln[P/(1-P)] = b_0 + b_1 d$ 模式计算所得到的用不同观察终点的基准剂量(BMD)和 95%可信限下限的基准剂量(LBMD)。

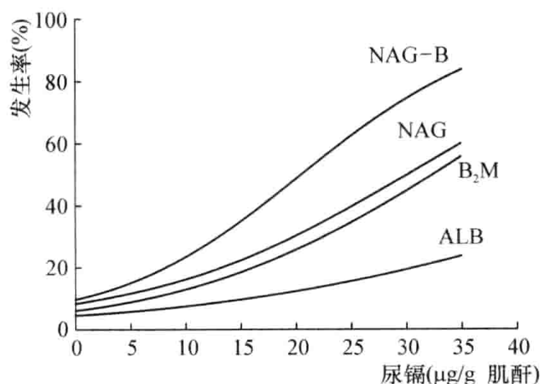


图 9-1　尿镉与尿 NAG, NAG-B, B_2M 和 ALB 异常率间的剂量、效应关系

表 9-1　不同肾功能损伤指标的尿镉 LBMD 值

标志物	n	b_0	b_1	基准剂量	LBMD-05	P
UNAG	790	−2.330	0.113	4.48	2.08	0.504
UBMG	790	−2.802	0.086	7.91	3.74	0.590
UALB	790	−3.180	0.058	14.94	9.78	0.316

方程：$\ln[P/(1-P)] = b_0 + b_1 d$
P 值由 Pearson 拟合卡方试验测得，$P > 0.05$ 表明方程拟合好。

从图 9-1 可见，肾脏损伤出现的早期指标是尿 NAG。尿 NAG 反映了肾近曲小管的损伤情况，说明在低浓度镉污染的情况下，主要的损害部位是肾脏的近曲小管。镉所引起的各肾脏损伤指标的 LBMD 值是不同的，依次为 UNAG-B，UNAG，UBM 和 UABL。白蛋白的 LBMD 高于其他指标，提示肾小球损害晚于肾小管损害；而 NAG-B 的 LBMD 值最低，证明 NAG-B 是监测肾小管损害的相对敏感的指标。从剂量-反应曲线和 BMD 的统计可知，额外增加 5% UNAG 异常风险的尿镉基准剂量的 95%可信限下限(LBMD)为 2.08 μg/gCr，表明尿镉浓度≥2.08 μg/gCr 时，人群有 95%的可能尿 NAGB 异常的风险增加 5%。

(三) 镉的人群暴露评价

在确定剂量-反应关系后，需要确定人群的暴露水平。镉的暴露包括从生产和生活环境中经口和呼吸道等途径摄入。

1. *资料收集方法*　污染源地选取了华东地区某镉冶炼厂。该厂 1961 年建成投产，工业废水未经任何处理直接排放到了工厂前面的河流，年排放量约为 10 万吨。1987 年的调查资料表明，根据我国环境镉的卫生标准(地表水镉 0.01 mg/L，土壤镉 0.1 mg/L)计算，河水镉平均含量超标 2.5 倍，土壤镉含量超标 6.6 倍。

环境研究人群来自 3 个不同的乡村，重污染区的村庄距离冶炼厂约 0.5 公里，中度污染区的村庄约在 12 公里外，而对照区则距离冶炼厂 40 公里外。从 1961 年到 1995 年，中度和重度污染区的居民引用受污染的河水灌溉农田，并且以自家生产的大米作为主食。环境暴露中，食品中的镉摄入是其主要的摄入途径，被镉污染的稻米是重要的镉来源。调查人群为一直居住生活在当地并食用当地产大米的居民，所有镉重污染地区和中污染地区的居民食用自产大米均在 35 年或 35 年以上。参与调查的总人数为 790 人，分别为对照组 253 人、中度污染区 243

人、重度污染区 294 人。各地区的人群特征如年龄、性别分布和出生日期等方面的资料从当地的人口统计部门得到。同时，收集 1960 年后营养调查的历史资料，目前的营养状况则通过每个地区随机抽取的 10 户家庭所进行的调查来进行评价。这三个地区生活、社会和经济条件以及生活方式等基本相似。所有研究对象在调查时居住在家里而没有失访。要求参与者回答一份详细的调查表，并提供血样和尿样。每份调查表的填写又经过严格训练的调查员监督完成，调查表包括职业和环境镉暴露的信息及香烟的使用情况。同时，测量对象的身高和体重并得出体质指数(body mass index, BMI)。对照区的选择来自非镉污染的地区，同时考虑年龄、性别、营养状况和社会经济因素。

职业研究暴露人群源自居住于污染区的该冶炼厂工人，两个对照组分别选自镉污染区居民和非镉污染区居民。职业镉暴露人群(A)来自该冶炼厂烧结车间、镉电解车间工龄在 1 年以上者共 44 人，这些人曾经在冶炼厂工作过，同时生活在镉污染区，他们的平均工龄为 8.5 年(1～15 年)。另选当地健康的居民 88 人为对照组(B)，他们从未在该冶炼厂工作过，但生活在 A 组人群相同的污染区内。选择 C 组人群，为既未在该冶炼厂工作过，也不生活在镉污染区的居民(1998 年测定的米镉浓度为 0.05 mg/kg)。这三组人群的生活习惯，社会和经济条件，生活方式基本相似，所有调查对象年龄均在 36 岁以上：A、B、C 三组人群年龄分别为 48.8、48.6 和 50.3 岁，统计分析表明三组之间不存在年龄，性别和吸烟习惯上的差别。

2. *暴露评估* 土壤镉含量测定根据中国土壤铅镉测定标准推荐的方法，分析发现高污染区表层土中具有很高的铅镉浓度，大于对照区近 20 倍。米镉含量测定为采集各地区大米样品 10 个，重度污染区增加采集来自新农户家中的大米样品 7 个，每个样品由 5 户居民的食用米混合组成(1 kg/样品)，分析表明，米镉浓度高达 3.7 mg/kg(超过国家标准 0.2 mg/kg 达 18 倍)。在职业环境空气中镉含量测定时发现该冶炼厂车间劳动条件差，硫酸车间有含镉粉尘逸出，镉电解车间有镉蒸气和镉烟逸出。当地历史监测数据显示，车间空气中镉浓度变化区间为 0.026～3.623 mg/m^3(平均浓度为 0.655 mg/m^3)。研究采用浓缩法一次性采集各车间空气中的镉粉尘，采样布点于工人操作岗位(呼吸带高度)。分析发现车间空气镉浓度为 0.61～3.54 mg/m^3。在香烟中镉含量测定时，由于本研究地区没有香烟生产，居民所抽的香烟为商品烟，因此，测定了 8 种不同的商品烟，发现镉浓度为 1.5 mg/kg，约为 0.002 mg/支(6 种中国产香烟的不同浓度分别为 1.5、1.32、1.38、1.62、1.41 和 2.02 $\mu g/g$)。调查发现因吸烟而累积的总镉摄入量约为 4.05 mg，明显低于来自食物的镉摄入。

总镉摄入量估计：镉摄入量＝生产场所镉摄入量＋生活环境镉摄入量＝生产场所镉摄入量＋食物(米)镉摄入量＋吸烟镉摄入量。

其中：工作场所镉摄入量＝工作场所空气中隔浓度(mg/m^3)×每小时有效通气量(m^3/h)×每年工作时间(40 h/周×50 周/年)×工龄(年)×吸收系数(0.03)。

米镉摄入量＝大米平均镉含量(mg/kg)×每天消耗大米量(kg/d)×年龄系数×暴露年数×365×吸收系数(0.05)。

吸烟镉摄入量＝卷烟平均镉含量(mg/支)×每天吸烟量(支/天)×吸烟年数×365×吸收系数(0.03)。

工作场所镉浓度按各车间不同工段采集粉尘样品中镉浓度的均值计。每小时有效通气量＝(潮气量－解剖无效腔)×呼吸频率。年龄系数(0～9 岁：0.413；10～19 岁：0.885；20～59 岁：1.000；60 岁及以上：0.823)。

由于研究中，来自香烟的镉摄入量对总镉摄入量的影响很小，因此在计算总镉摄入量时并

未将香烟的影响考虑在内。这样，以1997年的监测结果为例，三组环境研究人群的平均总镉摄入量分别为：对照组，22.4(11.3～36.6)mg；中度污染区，105.8(85.7～117.1)mg和重度污染区，545.1(256.8～582.5)mg。

表9-2显示了不同人群不同性别总镉摄入量、血镉和尿镉水平的几何均数值。

表9-2 职业研究不同地区和性别间总镉摄入量、血镉和尿镉水平(几何均数，GM)

测定项目	总人群			女性			男性		
	n	GM	范围	n	GM	范围	n	GM	范围
总镉摄入量(mg)									
A组	44	683.9*	(548.7～976.0)	11	731.1*	(685.7～854.4)	33	668.3*	(601.3～976.0)
B组	88	540.8*	(456.8～582.1)	22	543.3*	(530.2～577.1)	66	539.5*	(456.8～582.0)
C组	88	19.7	(12.7～33.9)	22	17.8	(14.1～22.6)	66	20.4	(12.7～33.9)
血镉(μg/l)									
A组	44	9.66*△	(2.13～44.75)	11	13.27*	(3.63～35.38)	33	8.69*△	(2.13～44.75)
B组	88	7.82*	(0.75～32.88)	22	8.51*	(2.75～32.88)	66	7.59*	(0.75～32.38)
C组	88	1.53	(0.00～8.00)	22	1.63	(0.00～3.63)	66	1.50	(0.13～8.00)
尿镉水平(μg/g肌酐)									
A组	44	11.86*	(1.69～55.72)	11	18.97*	(5.52～55.72)	33	10.30*	(1.69～42.19)
B组	88	9.51*	(2.06～42.99)	22	10.84*	(5.03～42.99)	66	9.12*	(2.06～28.9)
C组	88	1.81	(0.00～5.72)	22	1.55	(0.09～4.76)	66	1.91	(0.29～5.72)

*和C组比较：$P<0.05$
△和B组比较：$P<0.05$

总镉摄入量和尿镉之间，血镉和尿镉之间的相关关系分别为0.62($P<0.001$)，0.64($P<0.001$)和0.55($P<0.001$)。

(四) 镉的危害特征

综合整个资料分析：尿镉反映了体内镉的蓄积水平，镉暴露水平中镉摄入量和血镉与尿镉之间存在相关性，尿镉是反映体内镉负荷及肾脏中镉蓄积程度的一个很好的指标，尿镉≥2 μg/g Cr，高NAG尿和高白蛋白尿发生率相应升高，其中高NAG尿发生率超过10%，而当尿镉≥10 μg/g Cr时，高白蛋白尿的发生率也超过10%。高污染区尿镉高的原因是米镉含量高引起，高污染区食用镉污染的米，若每天进食0.5 kg大米，则每天进入体内的镉高达1 850 μg。大米中的镉由冶炼厂的废水灌溉农田引起，致使土壤中镉的含量不断增加。通过镉摄入量直接估计镉的摄入水平虽然比较直接，但由于人们的生活习惯存在很大差异，此方法有很多不确定因素。对照组在排除了职业镉暴露和米镉未超标的情况下，尿镉的几何均数为1.81，低于NAD的基准剂量(LBMD)2.08，表明国家对于米镉的标准制定是可行的。在污染区，职业和生活环境的镉暴露，引起体内镉积蓄升高，大于NAD的基准剂量(LBMD)2.08，将引起各种肾功能损害。

由以上案例分析可见，危险性评价必须通过危害识别、剂量-反应关系评价和人群暴露评估，阐明受试化学物的危害效应(如镉的肾功能损害)，剂量反应关系及阈值剂量(如BMD值)，接触人群特点和暴露途径(如含镉大米的摄入)，以及各种不确定因素，从而为危险性管理提供可靠的依据。

第三节 健康危险度评估的发展方向

随着社会的发展和科学技术的进步，大量的化学物进入或存在于人们的生活和环境中。而目前对新化学物及现有化学物的毒理学安全性评价和健康危险度评价由于其人力、财力、物力和时间的花费，完全不能满足需求。同时，由于动物福利问题越来越趋于重视，减少、优化和替代动物实验也是当前的迫切要求。并且，由动物实验向人群的推演、高剂量向低剂量的推算等的不确定性以及不同个体的易感性差异等，也提示需要改进毒性测试技术和健康危险度评估方法。

一、遗传易感性

随着生命科学的发展和检测手段的进步，高灵敏度和高通量的探测方法不断出现。由于基因分析技术的快速发展和在不同领域的广泛应用，基因组和个体的遗传背景已能被解析。研究发现暴露和疾病的产生有很大部分可用遗传背景的不同及遗传变异来解释。从 20 世纪 90 年代初人类基因组计划的启动，至人类基因组序列图谱的完成，奠定了揭开人体奥秘的基础。进而，单核苷酸多态性（不同个体 DNA 序列上单个核苷酸碱基差异，SNP）的发现、表观遗传学研究的进展、国际人类基因组单体型图计划（HapMap 计划）及比较基因组学等的推进，为更多地了解机体对环境的易感性和对疾病的抵抗力大小打开了重要的途径。因此，在运用人群资料作健康危险度评价中，运用基因组资料，在健康风险评价中探讨遗传因素在暴露-效应中的作用，确立遗传易感生物标志并将人群及个体易感生物标志进入健康危险度评定和危险管理成为可能和必要。

二、毒性测试技术的发展趋势

随着基因组学、表达组学、表观遗传组学、蛋白质组学和代谢组学等这些前沿科学的发展，并推动了生物信息学的发展，使我们能在一个实验或一个研究中检测和分析整个的遗传信息、基因群的表达变化，可以从宏观至微观再至宏观，不局限于单个基因，使分析化学物诱导的毒性反应-疾病发展过程中的毒性通路和特殊基因群的作用成为可能，使探讨早期的生物效应标志群成为可能。由于在不同的时间和过程中，作为生物标志的每个基因或每一群组基因均有不同的表达相和表达高峰，因此通过高通量分子生物监测，可以研究探讨更低的、甚至是接近人类的实际暴露水平和效应间的关系、短期和长期暴露的关系以及多种效应之间的关系。将这种“组学”技术运用于危险度评价，可以监测从 DNA 水平至蛋白质及代谢水平的变化，从整体网络系统观察机体对外来化学物的反应，通过计算机工具从中抽提信息，并与其他信息库及发表的文献进行比对，从而识别化学物诱导的主要毒性通路，并通过比较传统的毒性终点来保证“组学”反应紧密匹配于毒性相关的病理生理改变（如组织病理及临床生化指标的改变）。因此美国 NRC 起草的科学咨询展望报告“21 世纪毒理学测试新技术（TT21C）”中，提出了体外方法、系统生物学、计算机为基础的模型转化与技术转变，强调了应该在人类生物学数据基础上优先使用人的细胞系进行安全评估和预测，采用基于毒性通路的方法去评估化学物暴露的效应，从而解决基于动物高剂量测试研究外推到普通人群低剂量暴露的问题，极大减少对实验动物的依赖，使健康风险评估提供与人更加相关的科学基础；并且使获得良好结果所需要的时

间和代价也大大减少。

目前，毒理学家在整个毒性评价过程中融合由敏感的分子和基因实验为基础所得的结果，进而进行健康危险度评价时所面临的挑战有：①随着高通量的分析数据的出现，如何挖掘毒性通路的关键数据，分析通路变化与有害效应/反应之间的关系是首先要面临的任务。②毒性组学数据具有较高的动态变化。传统的毒性测量如组织病理改变常常是稳定和不可逆的，而无数由毒性反应诱导的分子、生物化学和细胞改变常常是动态的，频繁的改变可能以小时计算。因此，在所观察到的大量的变化数据中，有些可能是化学物对特殊靶点的直接效应，而有些可能是对最初损伤所引起反应的补偿和反馈变化。确认在健康终点时的关键基因表达群及建立生物标志是目前所面临的挑战。③在实际运用中，特别在运用体外模型进行预测的运用中，如何构建合适的细胞模型并将体外测试结果外推到整体结果的剂量-反应关系模型仍是一个重大的挑战。但是，尽管尚有许多未解决的问题，“组学”改变的模式很可能可以提供毒性反应的印记特征，从而对毒性预测具有重大的价值。

三、暴露评估和暴露组学

由于人类生活在一个复杂多变的环境中，接受的化学物暴露并非一种，同时，产生的疾病或效应也可能是多因素引起的。因此，如何评估暴露和效应的关系，特别对一些复杂多病因疾病来说是一个挑战。近来暴露组学的概念已被提出来。暴露组学（exposomics）定义为研究一个人一生中的所有暴露以及这些暴露对人类疾病过程的影响。要研究一个人一生中的所有暴露以及这些暴露对人类疾病过程的影响，不仅要了解如空气、水和食物中的环境暴露，还要考虑炎症、应急、脂质过氧化、感染、肠道菌群和其他自然过程产生的内源性化学物质，并要认识化学物质在体内对于关键分子、细胞和生理过程介导的效应。暴露评估可以从环境中的空气、水、食物内的污染物入手，进而分析主要物质的摄入量、代谢等，这称之为自下而上的方法（bottom-up），也可以从血液或其他体液内的物质入手，分析各类物质与疾病之间的关系，这称之自上而下的方法（top-town）。目前，暴露组学研究尚面临许多挑战：如何确立如噪声等的内暴露标志，不同的时间阶段可能有不同的暴露且个体差异大，如何形成灵敏而特异的检测方法等。因此，暴露组学研究任重而道远。

第四节　危险管理和交流

化学物的毒理学安全性评价和健康危险度评定的最终目的是为了危险管理。危险管理是根据安全性评价和危险度评价的结果，制定各种化学物的卫生标准、相关的法规条例和管理措施，并将标准、条例、措施付诸实施，从而达到保护人民群众身心健康的目的。

一、危险管理

危险管理包含着以下 5 个重要的因素：危险管理的对象，法律法规的制定和危险管理方针，化学物管理的可行性，危险管理的费用效益比较，危险管理的公共接受度。

（一）危险管理的对象

危险管理涉及的领域有：食品领域，如对各种食品添加剂和农药残留等的管理；药物领域，如对药品，药品残留物的管理；劳动保护领域，如作业场所暴露于作业人群的化学物的管理；化

妆品领域；环境污染控制领域，如对空气、水和土壤污染的管理。目前，我国行政管理部门对化学物采用分类分级管理的办法，即对不同类别、不同毒性级别的化学物采用不同的管理尺度，决定其能否使用及使用的范围、数量和条件。因此，确定化学物的毒性大小与性质是必须要解决的问题，也是进行管理的基础。毒理学安全性评价及危险度评价是行政管理部门获得化学物毒性资料的主要来源，起着关键的作用。

（二）法律法规的制定和危险管理方针

毒理学家对化学物的毒理学研究和政府管理机构对化学物的管理在目的和操作过程中是有区别的。科学研究注重于调查和解释自然现象，寻求真实，而政府部门作为一个管理机构，主要是通过管理来影响人们的行为，调节人们的争议。由于毒理科学的发展、新技术的使用和研究的深入，人们对于化学物的毒性、毒效应、暴露机会及其作用机制的认识是逐步深化、不断完善的。原来认为是安全的化学物，随着时间的推移，可能发现其具有某种潜在毒性，或可能有致癌致畸致突变作用。由于研究手段和观察角度的不同，人们会得到不同的实验结果或对相似的实验结果做出不同的解释，或者对一些新的发现、新的进展会有不同的看法，以至于产生争论。在科学研究中，这些深入的研究和争论有利于发现真实的自然。危险管理部门由于时间的限制，管理者往往不能等到所有的情况都了解后再做出决定，必须根据当时所掌握的资料作出最好的决定，采取各种管理措施。因此，管理者只接受毒理学的基本原理、普遍规律及公认的观点，制定出具有权威性和强制性的法规条例和标准范围，这些法规条例和标准范围具有相对的稳定性，从而阶段性地、有效地对化学物进行危险管理，规范人们的行为，使之在已制定的允许范围内活动。在缺乏很完善的数据的情况下决定管理政策，首先要运用已有的最好的证据，由局部研究改进证据，运用多学科调查，对特殊人群特殊关注，从而形成良好的管理决策。

在制定化学物的管理标准时，将针对不同的目的，采用不同的标准来决定化学物是否安全或有害。食品添加剂改善条约，要求新物质的使用者在人类可能暴露此化学物前就提出可以忽略有害效应的证据；职业安全健康条约，要求在暴露被限制以前，提出化学物有害性的证据。不同领域，必须制定不同的危险度评价政策，确定价值判断的准则和用于决策的政策取向，并形成文件，以确保其一致性和透明性。

（三）化学物管理的可行性

化学物的管理主要依据毒理学安全性评价和危险度评价的结果。毒理学安全性评价和危险度评价都应用统计学的概念和方法。毒理学安全性评价是提出化学物在特定的条件下不引起有害的健康效应的阈值，而危险度评价则是分析在一定的条件下化学物引起有害健康效应的概率。前者着眼于保证健康的安全性，后者认为安全是相对的，在人们的社会实践中，除非不允许使用，要想完全杜绝人们与应用中的化学物暴露是不可能的。因此，化学物管理的指导思想是控制化学物的使用，或使暴露不造成实际危害，或把危害降低到最低限度。保护所有的居民，使之具有知晓危险的权利，使化学物管理在实际管理中是切实可行的。

（四）危险管理的费用效益比较

危险管理，不同于纯科学的研究，必须根据一定的经济条件，依据危险性评价结果，综合各方面的得失，权衡利弊，决定取舍，从而作出切实可行的决策。如果某化学物毒性大，易于污染，难以控制，又有替代品可使用，费用大于效益，则可禁止此化学物的使用。有些化学物的作用无可取代，必须使用，使用效益大于费用，就必须建立相应的管理措施，制定卫生标准，对生

产和生活环境进行监测监护，使危害低于可接受的危险水平。但是，在危险管理决策中，保护人类健康是首要考虑的问题。由于在实际管理中，费用效益比较常常是最后的决定因素，因此在考虑费用效益而进行决策时，这些决策必须是合理并透明的，有关的决策标准应根据新的科学发现和技术更新，进行周期性的修订。

（五）危险管理的公共接受度

危险度评价中提出的可接受的危险性是指某人群暴露某化学物时，产生某种有害效应的概率与没有暴露人群的健康危害发生概率非常接近，暴露化学物引起健康危害的可能性为人们所能接受而达到忽视的程度。尽管危险管理者提出了可接受的危险度水平来明确化学物的危险程度，但是这不等同于公共的接受度。人们经自己的选择甚至可能自愿接受一些相对高的危险性，如吸烟；但是在某些情况下人们将会拒绝接受很低的危险性，例如在食物中低浓度杀虫剂残留物的危险性。因此，制订化学物的卫生标准往往是根据科学资料、社会和公众利益以及政策等各个方面而作出的判断，并不断地加以修正。

目前，我国和危险管理相关的法规标准，有职业病防治法、危险化学品安全管理条例、职业卫生标准、药品管理法、食品卫生管理法等，这些法规标准有的可在网上找到，有的以书籍形式出版，有的可向相关的管理机构询问。许多国家包括我们国家都有化学品注册登记制度。我国还有相关监督机构进行预防性和经常性的监督，从而监测和评价管理措施的效果。

在危险管理过程中，毒理学研究和危险管理有着相互促进的方面：一方面，毒理学的各种研究资料为合理地制定法律法规和管理控制措施提供了必不可少的科学依据；另一方面，这些法规和管理控制措施又对毒理学提出了更高的要求，如对毒理学实验的设计和实施作了明确严格的规定和要求，包括实施“优良实验室规范(good laboratory practice, GLP)、“临床研究质量规范(good clinical practice, GCP)”等，因此，危险性管理促进着实验毒理学等有关学科的发展。同时，毒理学家在危险性管理中起着必不可少的作用，危险性的管理需要行政管理人员和毒理学家的共同参与和密切合作。毒理学家提供的毒理学原理和实验数据将作为政府机构制定防治法规、做出决策的支撑和基础，如根据毒理学安全性评价或危险度评价结果，确定哪些化学物可投入市场，批准或禁止某种化学品的生产和使用等方面。另一方面，行政管理部门通过制定标准、规范、程序、准则对毒理学研究的设计和执行施加重要的影响，而政府部门的这些实验标准、规范、程序、准则受到毒理学家的多数意见的影响，许多毒理学家就在政府部门工作。毒理学家在危险管理中的主要作用有：对化学品进行毒理学评价，参与各种法律法规卫生标准的制定；提供危险品管理的技术支持和技术咨询；参与化学事故的应急救援。

二、危险信息交流

危险信息交流是所有涉及化学物的个体、组织、机构、与部门间交换关于危险评价和危险管理信息意见的相互交流和影响的过程。有效的危险信息交流能促进危险性管理。危险信息交流所涉及的对象有：政策决定者和管理者，企业家和利益相关者，消费者，毒理学家，医务人员，实验人员和劳动者，律师，法官等。由于危险管理涉及不同的人群，各个群体具有不同的立场，因此危险信息交流必须贯穿于危险评价和管理的每一个过程，目的是在危险信息交流者之间建立互信，使所有涉及者、参与者认识和理解危险评价和管理的具体问题，取得一致的见解，从而增强危险性管理决定和决策的一致性及透明度；并通过交流，加强公众的宣传教育，培养公众对危险性管理决定的信任，从而使危险性管理措施得到各方的支持，能更有效地执行。由于危险信息交流是个体、群体以及机构之间交换信息和看法的相互过程，除化学物本身的危险

信息以及国家或相关机构在危险性管理方面发布的法规和措施外，也包括公众对危险的关注、意见和相应机构的反应等。有效的危险信息交流强调双向的作用过程，而不只是单向的危险信息发布，要听取有关人员和公众的反馈、了解他们真正关心的问题，并能使其参与危险性管理政策的制定，才能在危险信息交流的双方建立起真正的信任，产生积极的效果。

危险信息交流的基本原则：①视交流对象为伙伴，倾听各方面的意见，了解他们的动机、观点，和所关注的问题。②认真仔细策划，请相关专家参与，使交流的信息准确、易于理解。③正确认识危险性，承认目前存在的问题，诚实、公开，并及时传递必要的信息，确保危险评价和管理信息的透明性。

危险信息的交流内容是交流中的成功关键。危险信息交流主要包括 3 个方面：①危险的性质，内容主要包括危害的性质、特点、程度、严重性和紧迫性；暴露危害的可能性和危害人群及其特点；与危害相关的可能和实际受益，及其受益的人群和重要性。②危险性评价的方法、结论和不确定性，内容主要有评价危险所采用的对象、方法和其灵敏度、特异度，不确定性的假设和重要性，评价所得的结论对危险管理决定和措施的影响。③危险性管理措施，内容主要有：危险管理的决定、控制和管理危险的措施，采取这些行动的理由、有效性、利益、费用和实施后依然存在的危险。

对交流活动进行评估，这是危险信息交流的不可缺的内容。通过评估危险信息资料和交流工作的有效性，监测危险管理措施的准确执行和事件的解决程度，不断修正、调整和完善交流活动，能使危险管理和危险交流更上一层楼。

由于危险信息交流处于复杂的社会背景中，因此它必然会面临一些障碍或困难。由于社会公众的文化知识和科学水平背景各异，他们对危险概率的理解难以测知，将科学的信息用易于理解的方式向公众准确地表达出来有一定的难度，如解释危险概率大小，解释进行危险概率的估量等。受化学物直接暴露人群和一般公众对危险度的认知状态也不同，尤其是受化学物直接暴露人群在危险度是由他人控制而不是由暴露人群自身控制的情况下，减少暴露人群对危险的担心会面临障碍或困难。危险信息交流也会受到危险信息的来源是可信的或不可信程度的影响。与危险利益相关的机构和人员可能会干预危险信息的公正发布，陈旧的新闻观念会影响危险信息发布的正确。在和媒体进行危险信息交流中，由于未知、陌生和罕见的事件和危险性更能引起公众的注意，要避免不确切的危险信息内容传送。由于各种复杂因素影响到公众对危险信息的认知及心理状态，从而影响到信息交流的实际社会效果，因此有效地进行危险信息交流，是今后须加强研究的领域。

（吴　庆）

第十章　毒理学应用及分支

毒理学的发展非常迅速，近 30 年来毒理学与相关学科的交叉形成了许多分支。毒理学的研究对象广泛，包括化学因素、物理因素、生物因素，而生物体包括人、动物、植物。因此毒理学与药理学、生理学、病理学、化学、生物化学、生物学有联系；与工业、农业、经济有联系；与法医学、临床医学、生态学及环境保护有联系；还可以说，它与地球上生命的整个未来有联系。因此，毒理学的分类非常复杂，可从不同角度分类。根据工作任务可分为卫生毒理学、临床毒理学、环境毒理学、工业毒理学、管理毒理学（也有称为法规毒理学）、生态毒理学与法医毒理学等；根据研究手段与终点不同可分为免疫毒理学、分子毒理学、膜毒理学、遗传毒理学、分析毒理学等；根据研究对象可分为昆虫毒理学、兽医毒理学、人体毒理学与植物毒理学；根据研究领域可分为金属毒理学、农药毒理学、食品毒理学、放射毒理学、药物毒理学；根据研究工作性质可分为描述毒理学（指常规毒性实验和安全评价）、机理毒理学和管理毒理学等。近年来还出现更多的毒理学分支，如比较毒理学、地理毒理学、急症毒理学等。本章主要介绍按任务分类的分支学科。

第一节　卫生毒理学

卫生毒理学是毒理学的重要分支，是毒理学在预防医学领域内的实际应用和发展。卫生毒理学与人类日常生活和生产劳动关系密切，如环境污染、食品的安全性及作业环境中的有毒物质都是世界范围内的严重问题。卫生毒理学是一门综合性学科，通常涉及的有化学、生物学、生态学、生物化学、免疫学、遗传学、病理学、预防医学、流行病学和卫生统计学等。随着医学生物学和环境科学的发展，卫生毒理学必将渗透到更为广泛的学科领域。根据研究对象和内容的不同，卫生毒理学又分为环境毒理学、食品毒理学和职业毒理学。卫生毒理学领域内的各个分支的研究手段基本是相同的，最重要的区别是在于危险度管理时，应按接触者不同亚群的特征进行管理。

一、食品毒理学

（一）食品毒理学概述

食品毒理学是研究食品中外源化学物的性质、来源与形成以及它们的不良作用与可能的

有益作用和机制，并确定这些物质的安全限量和评定食品安全性的一门学科。食品毒理学的作用就是从毒理学的角度，研究食品中可能含有的外源化学物对食用者健康的危害、检验和评价食品（包括食品添加剂）的安全性或安全范围，从而达到确保人类健康的目的。

在典型的中国膳食中，含有数以千计的化学物，其中有营养素和非营养素成分，也有食品污染物和食品添加剂。由于食品在生产、储存、加工、运输和烹调等过程中不可避免地会带来一些有害因素，人们已认识到绝对的食品安全难以做到。解决问题的方法之一是在食品毒理学研究的基础上建立食品卫生标准，后者经过立法程序审定，具有法律效能，可用于对市场上以及进出口的食品进行有效的卫生管理。因此，食品毒理学研究尤其是食品安全性评价对于确保食品安全具有十分重要的作用。

（二）食品中常见毒性物质

1. *动物组织中的有毒物质*　动物类食品是人类最主要的食物来源之一，由于其营养丰富、味道鲜美，很受人们欢迎，但是，某些动物性食品中含有天然毒素，会引起食用者中毒。

家畜肉，如猪、牛、羊肉等是人类普遍食用的动物性食品，在正常情况下，健康动物肌肉是无毒的，但其体内的某些腺体、脏器或分泌物中含有激素、病原微生物和一些毒素，影响人的身体健康。如牲畜腺体所分泌的甲状腺素、肾上腺素和病变的淋巴结，在没有摘除彻底的时候，会导致误食而引起中毒。

动物肝脏是富含蛋白质、维生素 A 和叶酸的营养食品，但同时也含有胆固醇及胆酸等对人体不利的成分，过量维生素 A 的摄入也会造成中毒。动物肝脏中还可能存在着机体本身代谢产生的毒素和病原体带来的有毒物质以及寄生虫等，对动物肝类食品的安全性构成了潜在的威胁。

海产品毒素大多不限于存在于单一的种属中，例如已知有 400 多个种属可导致鱼肉中毒，海产品毒素通常可按照中毒部位分类。如鱼肉毒素集中于肌肉、皮肤、肝脏和小肠，与生殖系统或循环系统无关；鱼卵毒素与生殖组织有关，例如在鲤鱼、梭子鱼、鲟鱼、鲶鱼、大头鱼等的鱼卵和卵巢中存在，这些毒素是热稳定性的脂蛋白毒素；鱼血毒素局限于循环系统，如鳝鱼，它们的血中含有鱼血毒素；而鱼肝毒素则局限于肝脏；河豚毒素则几乎分布于任何组织，且卵巢、鱼卵、肝脏、肠道和皮肤的毒性最高。

贝类的种类很多，至今已记载的约有几十万种，可作食品的贝类约有 28 种，已知的大多数贝类均含有一定数量的有毒物质，实际上，贝类自身并不产生毒物，但是当它们通过食物链摄取海藻或与藻类共生时就变得有毒了，海藻主要感染蚝、牡蛎、蛤、油蛤、扇贝、紫鲐贝和海扇等贝类软体动物，足以引起人类食物中毒。贝类毒素主要有麻痹性贝类毒素、腹泻性贝类毒素和神经性贝类毒素 3 类。

2. *植物类食品的天然毒素*　植物是人类粮食、蔬菜、水果的来源，也是动物赖以生存的饲草和饲料的来源，许多医药和兽药也来自植物。植物种类有 30 多万种，但用作人类食品的不过数百种，用作饲料的也不过数千种，这主要是由于植物体内的毒素限制了其作为人类食用和畜用资源的价值。植物性毒素是人类食源性中毒的重要因素之一，对人类健康和生命有较大的危害。

植物性毒素可分为 5 类。①致甲状腺肿物质，如芥菜、油菜、十字花科蔬菜中含有芥子苷，它的配体糖可在芥子酶作用下分解成异硫酸酯、腈、硫氰酸盐等有毒物质，芸薹属植物中也含有致甲状腺肿的物质。②生氰糖苷，是由氰醇衍生物的羟基和 D-葡萄糖缩合形成的糖苷，广泛存在于豆科、蔷薇科、稻科约 1 000 种植物中，生氰通过生氰作用，能产生毒性很强的氢氰

酸。由于这些植物可以作为食物和饲料，所以以前经常发生人畜中毒事件。③蚕豆中含有的毒素能引起急性溶血性贫血病，甚至引起婴儿和儿童死亡。④山黧豆属的豆类能引起山黧豆中毒性骨病，表现为骨头畸形和骨关节脆弱。⑤豆类中还含有外源凝集素、过敏源、消化酶抑制剂等，可引起各种不良反应。

3. *食品中的生物毒素* 真菌在新陈代谢过程中会产生大量化学结构各异的生物活性物质，这类物质中很多对人和动物具有毒性，被称为真菌毒素。真菌毒素一般分为霉菌毒素和蘑菇毒素两类。目前已知的真菌毒素已有200多种，其中有相当部分具有较强的致癌和致畸性，最重要的霉菌毒素是黄曲霉毒素。我国有可食用蕈300多种，毒蕈80多种，因误食可引起毒蕈中毒的有10多种。

（三）食品添加剂

根据《中华人民共和国食品卫生法》的规定：食品添加剂是指"为改善食品品质和色、香、味以及为防腐和加工工艺的需要而加入食品中的化学合成或者天然物质"。在我国，食品营养强化剂也属于食品添加剂。食品添加剂最重要的是安全、有效，安全性则更为重要。违法添加的非食用物质和滥用的食品添加剂是目前中国食品安全的重要问题。各国对食品添加剂的使用大多采取许可使用名单制，并通过一定的法规予以管理。要保证食品添加剂使用安全，必须对其进行卫生评价。这是根据国家标准、卫生要求，以及食品添加剂的生产工艺、理化性质、质量标准、范围、加入量、毒理学评价及检验方法等作出的综合性的安全评价，其中最重要的是毒理学评价。通常，每种物质当以足够大的剂量进行喂饲时，都可产生某种有害作用。安全性评价则应鉴定这种可能的有害作用，并利用足够的毒理学资料来确定认为该物质安全的使用剂量。

目前，国际上使用的食品添加剂种类已达14000种。食品添加剂按功能用途分为不同类别，在我国分为23类(GB 2760—2011)。在现代工业社会中，几乎所有的加工食品均含有或多或少的食品添加剂。如加工的海产品含有70多种食品添加剂，我们在喝果汁饮料时就摄入了包括异抗坏血酸、活性炭、海藻酸、山梨糖醇、合成香料和羧甲基纤维素在内的多种食品添加剂。

但是，食品添加剂毕竟不是食品的基本成分。尽管添加剂在用于食品之前，其安全性已在实验室中进行了多次测试，但其使用还是在公众中引起广泛的争议与关注。的确，有些食品添加剂的安全性是值得怀疑的，尽管这类物质添加剂的量极其微小，但是我们不能因为它们添加的量极其微小而认为它们是无害的，因为要考虑到有些食品添加剂的持续使用在人体内有累积效应并长期作用于人体，即具有慢性毒性，如致癌性、致突变性和致畸性等，对人类健康具有潜在的威胁。另外，多种食品添加剂在混合使用时还有叠加毒性的问题。当它们和其他物质如残留农药、重金属等一起摄入时，使原本无致癌性的化学物质转化为致癌物质。事实上，在我国，除了基本的食品被农药残留等许多有毒的物质所污染外，在加工食品中还普遍存在食品添加剂滥用和严重超标的情况。例如2008年发生的三聚氰胺超标奶粉事件，2011年我国台湾发生的食品饮料中违禁添加塑化剂事件，对健康造成了很大的影响。因此，为了给消费者提供最大限度的保护，研究目前普遍使用的食品添加剂的慢性毒性及叠加毒性不失为明智的做法。

（四）食品安全

对食品中任何组分可能引起的危害进行科学测试、得出结论，以确定该组分究竟能否为社会或消费者接受，据此以制定相应的标准，这一过程称为食品的安全性评价。食品安全性评价

主要是阐明某种食品是否可以安全食用，食品中有关危害成分或物质的毒性及其风险大小，利用毒理学资料完整确认该物质的安全剂量，以便通过风险评估进行风险控制。所以，食品安全性评价在食品安全性研究、监控和管理上具有重要的意义。

食品中有毒物质的毒理学数据主要从动物毒理学实验中获得。毒理学研究并不意味着就能直接应用于人。从实验动物获得的毒理学数据外推到人群进行定量的风险性评价时，常常需要3个重要的假设：①实验动物和人群的反应性要相似；②接触的反应与人的健康有关，并可外推到环境接触(包括食品摄入)水平；③动物实验能够表现出被检物的所有反应特性，这种物质对人有潜在的毒副作用。通常在进行定量风险性评价时可能有很大程度的不确定性。从毒理实验获得的数据有限时，就需要运用流行病学方法进行分析。和毒理学相比，流行病学是一门观察学科。它存在接触和反应的时间差问题，有可能当人们已经接触某一危害物时流行病学还未能观察出结果。因此，对于新出现的化学物质，通过流行病学观察常常是没有用的，还需要依靠毒理学方法进行研究。

食品安全性评价方法包括初步工作和四阶段实验。初步工作包括两方面的内容：①了解受试物(必要时包括杂质)的物理、化学性质(包括化学结构、纯度、稳定性等)与受试物类似的或有关物质的毒性等资料，以及所获得样品的代表性如何，要求受试物能代表人体进食的样品。②估计人体可能的摄入量。获得这些资料后，根据动物实验结果推测受试物对人体的可能危害。如果动物实验的无作用水平比较高，而最高摄入量很小，也就是摄入量远小于无作用水平，那么，这类受试物就可能被允许使用。反之，如果高摄入量甚至平均摄入量接近无作用水平，则这类受试物就难以被接受了。四阶段实验则包括急性毒性实验、遗传毒性实验(蓄积毒性实验、致突变实验)、亚慢性毒性实验和慢性毒性实验(包括致癌实验)。

现代食品安全性评价除了必须进行传统的毒理学评价外，还需要进行人体研究、残留量研究、接触量研究、膳食结构和摄入风险性评价等。

二、环境毒理学

(一) 环境毒理学介绍

环境毒理学是环境科学和毒理学交叉的一个分支。它是从医学角度，利用毒理学方法研究环境特别是空气、水和土壤中已存在或即将进入的有毒化学物质及其在环境中的转化产物，对人体健康的有害影响及其作用机制的一门学科。环境毒理学主要研究污染物在环境中的变化、来源、迁移及微生物的作用、化学物的转运、转化、转归、毒性变化及其他行为改变的环境条件，对人类和生物种群的危害及其安全限值，也是应用毒理学方法和流行病学方法，研究大气、水和土壤或沉淀物中的环境污染物对机体的有害作用、作用剂量-反应关系、作用机制及危险度评价的一门学科。为预防环境污染物(农药、工业化学品、废气、废渣、废水等)的中毒及其对生活环境的影响，制定环境卫生标准及有关化学品的管理，提供科学依据。环境毒理学与生态毒理、野生生物毒理、法医毒理、环境化学以及食物链污染渠道密切有关。

环境毒理学是毒理学中发展最快的一门学科。自20世纪60年代发现汞、镉、多氯联苯、2,3,7,8-四氯二苯并-对-二噁英(TCDD)等对环境的污染以来，环境毒理学得到迅速的发展。随着近代工业的发展，环境污染日趋严重，人类的生活环境日益遭到污染，人体健康受到危害。特别是环境污染引起的公害事件的教训，促使人们进行深入的毒理学研究，以阐明环境中某些污染物或某几种污染物对生物体的作用及其机制，以致环境毒理学迅速发展为一门独立的分支学科，成为环境科学中必不可少的重要组成部分。

环境毒理学的研究对象是环境污染物,它的基本任务包括下列3个方面:①研究环境污染物及其在环境中的降解和转化产物对机体造成的损害和作用机制;②探索环境污染物作用于机体后最初出现的生物学变化,以便及早发现并设法排除;③定量评定有毒环境污染物对机体的影响,确定其剂量与效应或剂量-反应关系,为制定环境卫生标准提供依据。

(二)污染物在环境中的迁移和转化

污染物进入环境以后,由于自身物理化学性质的不同和各种环境因素的影响,会在空间位置或形态特征等方面发生一系列复杂的变化。污染物在环境中发生的各种变化过程称之为污染物的迁移和转化(transport and transformation of pollutants)。污染物在环境中的迁移和转化过程往往是相互依赖和伴随进行的一个复杂的连续过程。迁移为转化提供了环境条件,而转化又为迁移提供了新的理化特征等物质基础。研究污染物在环境中迁移和转化的过程及其规律性,对于阐明人类在环境中接触的是什么污染物,接触的浓度、时间、途径、方式和条件等都具有十分重要的环境毒理学意义。

污染物的迁移是指污染物在环境中发生的空间位置的相对移动过程。迁移的结果导致局部环境中污染物的种类、数量和综合毒性强度发生变化,引起污染范围的扩大或缩小,污染物浓度的降低或增高,污染物所处的局部条件重新发生或大或小的改变,这些现象都具有十分重要的毒理学意义。各种污染物在环境中的迁移方式可以归纳为机械性迁移、物理-化学性迁移和生物性迁移。

污染物在环境中发生的机械性迁移是一个十分常见的现象,尤其在人类生产和生活活动中,污染物的机械性迁移更是处处可见。例如,废气、废水和废渣的排放、丢弃、搬运以及各种有毒有害物质在生产和生活中的应用,均可使污染物发生不同程度的迁移运动。根据污染物在环境中发生机械性迁移的作用力不同,可分为气的、水的和机械性迁移3种作用。物理-化学性迁移是污染物在环境中最基本的迁移过程。无机污染物以简单的离子或可溶性分子的形式发生溶解-沉淀、吸附-解析等作用,有机污染物还可通过降解作用实现迁移。污染物在环境中的迁移常以物理-化学迁移的方式伴随着污染物的转化,并通过各种物理化学的作用力实现迁移的过程。具体包括风化淋溶、溶解挥发、酸碱作用、络合、吸附以及氧化-还原作用。污染物通过生物体的吸附、吸收、代谢、死亡等过程而发生的迁移叫做生物性迁移(biotransport),这是污染物在环境中迁移的最复杂而又最具有重要意义的迁移方式。根据其表现形式可分为生物浓缩、生物积累和生物放大3种类型。

污染物在环境中通过物理的、化学的或生物学的作用改变形态或者转变成另一物质的过程叫做污染物的转化(transformation of pollutants)。通常把由污染源直接排入环境的污染物称为一次污染物,在环境中发生各种反应而转化形成的污染物称为二次污染物。污染物的转化过程取决于其本身的理化性质和所处的环境条件。根据其转化形式可分为物理转化、化学转化和生物转化3种类型。物理转化指污染物通过蒸发、渗透、凝聚、吸附以及放射性元素的蜕变等一种或几种过程实现转化。污染物的物理转化与污染物的其他运动之间的伴随关系较为密切。如某些有机污染物通过蒸发作用由液态或固态转化为气态,逸散入空气中,这一过程既有物理转化作用,也有迁移变化发生。土壤、泥沙、木炭等物质吸附某些污染物时,既有污染物在分子微观形态上的改变,又有污染物的空间位置上的变化。化学转化作用指污染物通过各种化学反应过程发生的转化,如氧化-还原反应、水解反应、络合反应、光化学反应等。在大气中,污染物的转化以光化学氧化和催化氧化为主;在水体中,主要是氧化-还原反应和络合水解反应;在土壤中,一些农药的水解反应由于土壤颗粒的吸附催化作用而被加速,以致有时在

土壤系统中发生的水解反应比在水体系统还要快。生物转化和生物降解作用指污染物通过生物相应酶系统的催化作用所发生的变化过程。污染物在有关酶系统的催化作用下，可经由各种生物化学反应过程改变其化学结构和理化性质。污染物生物降解或转化的结果：一方面可使大部分有机污染物的毒性降低，或形成更容易降解的分子结构；另一方面也可以使一部分污染物的毒性增强，或形成更难降解的分子结构。例如，芳香烃类化合物的芳香环，可在单加氧酶的催化作用下裂解，生成邻苯二酚类物质，然后再被双加氧酶裂解成容易进一步降解的酸类或醛类物质。有机磷农药中的对硫磷和马拉硫磷，可因水解酶的催化作用，使其酰胺键和酯键断裂而失去毒性。

（三）常见环境因素的毒理学

1. *常见化学致癌物的环境毒理学*　根据WHO发表的资料，人类癌症中90%与环境有关，其中最主要的是与化学因素有关。人类环境中大量化学物质的存在和不断增加以及化学物质与人类癌症的密切关系，不能不引起世界各国的普遍关心和重视。在人类环境中，接触化学致癌物或可疑致癌物的种类和机会是很多的，其主要来源除工业“三废”污染环境外，还与滥用农药、化肥和某些药物以及食物中使用各种化学添加剂等都有一定关系。

多环芳烃类(polycyclic aromatic hydrocarbons，PAH)是被认识最早的一类化学致癌物。PAH是指两个以上的六碳苯环稠合在一起的一系列芳烃及其衍生物。目前已经发现的致癌性多环芳烃及其致癌性衍生物的数目已超过400种以上，这些多环芳烃，按其化学结构特点可以分为3类：苯环类、胆蒽类和杂环类。

环境中的多环芳烃主要来源于植物和微生物的内源性合成以及火山活动和一些矿物的成分，它们构成了多环芳烃的天然本底。人类大规模的生产活动，特别是矿物燃料的燃烧产生的多环芳烃散布到环境中构成环境污染。多环芳烃的人为污染主要来自家庭及生活炉灶、工业锅炉等产生的烟灰，各种生产和使用煤焦油的工业过程，露天焚烧和失火，以及车辆排出的废气等。

环境中的多环芳烃处于不断运动中，生成、降解或迁移、转化，并通过各种途径进入人体，多环芳烃也可通过降解而净化，大气中的多环芳烃主要由光的氧化作用降解，水生生物也能进行生物降解作用，此外，土壤中的微生物也能降解苯并[a]芘。

芳香胺类化合物，如2-萘胺、联苯胺、2-酰氨基芴、4-氨基联苯，N-亚硝基化合物，烷化剂，黄曲霉毒素也是主要的致癌物。

2. *金属的环境毒理学*　金属是环境中广泛存在的化学物质，在人类已知的化学元素中，80%以上的元素为金属元素。金属元素进入环境后，由于受到各种因素的影响，常常会在化学形态上发生变化，并在大气、水体、土壤和生物体间不断迁移和转化。虽然金属元素及其化合物几乎遍布于整个生物圈，但是在自然条件下，金属并未对人类乃至整个生物界构成严重危害。金属对环境的严重污染和危害是由于人类盲目而毫无节制地开发金属资源所造成的。20世纪中期，金属污染日趋严重，中毒事件频繁发生。日本曾因汞污染发生“水俣病”，镉污染引起“痛痛病”；70年代，伊拉克发生由于食用了被甲基汞污染的小麦而使8万人中毒的公害事件。这些震惊世界的公害事件促使人类对金属污染，特别是Hg、Cd、Pb等重金属的污染进行环境毒理学的研究。目前，已初步积累了金属元素在环境和人体内的分布资料，总结了许多常见金属的一般生物学和毒理学特性，研究已达分子水平，内容涉及金属与金属之间的相互作用，以及金属离子与各种蛋白质和核酸之间的相互作用及作用机制等方面，研究的广度几乎涉及全部金属元素。

3. *农药的环境毒理学* 农药是指在农业生产中用于防治农作物病虫害、消除杂草、促进或控制植物生长的各种药剂，主要包括杀虫剂、除草剂、杀真菌剂和植物生长调节剂等。目前世界上化学农药的总产量（以有效成分计算）在500万吨以上，并且仍以每年约5%的速度增长。我国近年来化学农药的产量在50万吨左右，居世界第二位。合理施用农药是保障农业获得丰收的一项重要措施。但是，不适当地长期和大量使用农药，会使环境受到农药污染，以至破坏生态平衡，对农业生产和人体健康等方面造成危害。

农药环境污染主要来源是农药的使用和农药的生产过程。环境中农药可以通过消化道、呼吸道和皮肤3条途径进入人体，危害健康。

在我国，最常用的农药主要有有机氯农药、有机磷农药、氨基甲酸酯类农药及拟除虫菊酯类农药。有机氯农药属于高效广谱杀虫剂，如DDT、狄氏剂、艾氏剂、六六六等，在我国过去使用的农药中，60%是有机氯农药。但是，由于有机氯农药性质稳定，在土壤、水体和动植物体内降解缓慢，在人体也有一定积累，有蓄积性和远期作用，对健康造成严重影响，是一种严重的环境污染物，目前已趋向被淘汰的地步，我国近年来已开始停止生产和使用有机氯农药。

有机磷农药具有杀虫效率高，残效期短等特点，所以受到各国的广泛重视。在我国生产和使用的有数十种之多，其中最常用的有美曲膦酯（敌百虫）、敌敌畏、乐果、对硫磷、内吸磷、马拉硫磷等。多数有机磷农药具有高度的脂溶性，除了可经呼吸道及消化道进入体内外，还能经没有破损的皮肤侵入机体。有机磷农药的中毒特征是血液中胆碱酯酶活性下降，从而导致神经系统功能失调，于是一些受神经系统支配的心脏、支气管、肠、胃等脏器发生功能异常，有些有机磷农药（如敌敌畏、美曲膦酯等）在引起急性中毒8～14天后，能产生迟发性神经毒性作用，主要表现为弛缓性麻痹等。

4. *内分泌干扰物的环境毒理学* 进入20世纪90年代以来，由于环境内分泌干扰物具有种类多、应用广、在环境中不易被破坏以及在生态系统中可以通过食物链被富集等特点，并随着越来越多关于环境激素对人类健康危害的研究成果的发表，有关环境内分泌干扰物种类及其对人类健康的危害及作用机制等问题日益引起学术界和公众的极大关注，也引起了发达国家政府、WHO等机构的高度重视。环境内分泌物质能干扰体内天然激素的合成、分泌、运输、结合、作用、代谢或消除，表现出天然激素或抗天然激素的作用，对人类雌激素、甲状腺素、儿茶酚胺、睾酮等呈现显著的干扰效应，从而破坏内分泌系统、神经系统和免疫系统等系统的信息相互传递和对机体的调节功能，进而破坏内环境的相对稳定，在临床上则表现为生殖障碍、出生缺陷、发育异常、代谢紊乱以及某些癌症为特征。

目前，怀疑对人类健康有直接影响的化学物质有200多种，已被证实而列入环境激素黑名单的有70多种，可分为农药、工业化合物及植物激素三大类。

三、职业毒理学

（一）职业毒理学概述

职业毒理学又称为工业毒理学，是运用毒理学的原理和方法，研究职业场所中涉及的化学及生物学危害因素，其目标是预防作业环境对工人健康产生的有害作用。职业毒理学主要研究工业化学物质（原料、中间体、成品、助剂、杂质和废弃物）的毒性、毒效应、代谢、作用机制及实验治疗，为制定职业卫生标准、防止职业中毒提供科学依据。常对新化学物质进行安全性评价和危险性评价，并结合作业场所的监测、工人健康监护及流行病学调查，确定无害作用水平、剂量-反应关系等，对接触面广和危害大的有毒物质，常进行生物标志物、作用机制的研究，为

早期诊断、生物监测指标、中毒防治提供依据。

职业毒理学利用毒理学的方法研究职业环境中有毒物质与职业人群之间的反应、作用规律以及防治措施。职业环境，又称生产环境，是指生产工人在工作过程中所接触的环境，它属于大环境的一部分，但有自己的特点，其有害化学物的水平一般高于外环境，所以职业接触也有其特点。职业接触的特点是生产环境与人体接触，接触途径以呼吸道和皮肤为主；由于在工作时间内生产环境中接触，所以接触的剂量相对较高，接触时间相对较短；直接参加生产的人员主要是健康的成年人，较少涉及老、幼、病、弱等易感人群。职业毒理学工作者的目标是预防作业环境对工人健康产生危害作用，由于非职业性接触会成为职业性接触的混杂因素，或者会增强工人个体的易感性，职业毒理学工作者务必对工人所接触的有害因素的种类做出评估，由于作业环境中常发生复杂混合物的接触，职业毒理学工作者还必须识别联合接触的特殊危害。所以，职业毒理学是集职业卫生、流行病学、职业医学和管理毒理学于一体的一门综合性学科。

职业毒理学在迅速发展过程中，将重点由研究工业毒物中毒机制，逐渐转向制定职业卫生标准和化学物的危险度评定。随着科学技术的发展，职业毒理学也面临着新的挑战。由于新技术的应用，控制和防护措施的加强，接触浓度的降低，典型的职业中毒已不多见，但亚临床中毒，或者对某些敏感器官或系统的早期损害依然大量存在。如何评价和控制这些早期损害，是职业毒理学的新任务。每年有大量新的化学物有待作毒理学评价，从分子水平上探讨职业中毒、职业肿瘤的病因和防治措施，都是新的挑战和任务。职业毒理学工作者应针对新生产条件下化学物质存在及对人体损害特点，认真研究在新生产条件下化学物质与职业人群之间作用的特点和规律，探讨控制措施，为保护工人健康做出应有的贡献。

（二）生产性毒物与职业中毒

化学性毒物在生产过程中能以多种形式出现，同一种化学物质在不同的管理生产过程中又可呈现不同形式，主要形式有原料、中间产品、辅助材料、成品、副产品或废弃物等。对于职业接触来说，化学性毒物空气污染的危害性最大。

在生产劳动的任何过程都有可能接触到毒物，主要的生产环节有原料的开采和提炼、材料的搬运与贮藏、材料加工和准备、加料、化学反应过程、出料、辅助操作过程以及在生产中的应用研究。

在生产条件下职业人群主要是通过呼吸道和皮肤接触生产性毒物。气体、蒸汽、气溶胶（粉尘、烟、雾）状态的毒物通常经呼吸道进入人体，通过肺泡直接进入血液，毒性作用大而迅速，许多职业中毒是由此途径而引起的。在职业环境中毒物经皮肤吸收也是一种较常见的途径。某些毒物可透过完整皮肤进入体内。经皮肤吸收途径有两种：一种是通过表皮屏障到达真皮而进入血液循环；另一种是通过汗腺、皮囊或皮脂腺，直接到达真皮。毒物经皮肤吸收后不经肝脏而直接进入血液循环。

职业性接触生产性毒物是否引起工人中毒，取决于一系列因素和条件：首先是毒物本身的特性，包括化学结构和理化性质；其次是接触的浓度和时间，空气中毒物浓度越高，接触时间越长，进入体内的毒物量就越大，工人越容易发生中毒，危害越严重；当空气中有数种毒物同时存在时，有些毒物之间有相加作用或增强作用，加强毒物的毒性；工作环境与劳动强度也影响毒物对机体的损害，高温环境下，毒物挥发性大，吸收量增加，体力劳动强度大时，毒物吸收得多，耗氧量大，使机体对导致缺氧的毒物更为敏感；除了上述因素外，个体感受性，如性别、年龄、生理变动期（孕期、月经期、哺乳期）、健康状态、营养、内分泌功能、免疫状态等都可影响不同个体

对毒物的反应。

机体一次或短时间内吸收大量毒物能引起急性中毒，小量毒物长期进入机体所引起的中毒称为慢性中毒，介于两者之间在较短时间有较大剂量毒物进入人体而引起的中毒称为亚急性中毒。毒物的急慢性中毒在临床上主要损害神经系统、呼吸系统、血液系统、消化系统及泌尿系统等。

职业中毒的诊断和处理是一项政策性和科学性很强的工作，它涉及职业人群的职业卫生保护及待遇的落实，与国家和患者的切身利益有关。由于生产作业现场条件复杂多变，工人在生产和生活中可能受到各种因素的影响，所以在职业中毒诊断时应综合考虑3个方面的因素：首先是患者的职业史，包括患者接触毒物的种类、有害作业工龄、使用毒物量、操作方式、接触情况及同工种工人发病情况，这是职业中毒诊断的前提；其次是工人工作现场的劳动卫生学调查，包括工人所在岗位的生产工艺过程、可能接触的职业性有害因素，空气中毒物的浓度、个体防护与个人卫生情况，从而判断患者在该作业环境中工作是否有中毒的可能性，这是诊断的基本依据；最后是患者的临床表现以及辅助实验室检查结果，根据临床表现来判断符合哪类毒物中毒，出现的症状与所接触毒物毒作用特征是否相符，实验室检查结果对这一中毒诊断具有十分重要的意义，包括能够反映毒物吸收的指标（如血铅，尿酚，发汞）、反映毒作用的指标（如铅对卟啉代谢的影响，导致δ-氨基-γ-酮戊酸（ALA）及尿、粪卟啉等指标的改变）以及反映毒物所致病损的指标。所测定的各项指标常是互相联系的，须结合起来判断。

职业中毒的治疗要针对其病因、症状进行，还要促进患者恢复，即所谓病因治疗、对症治疗和支持治疗。病因治疗在于解除中毒的原因，阻止毒物继续进入体内，促使毒物排泄以及抵抗或解除其毒作用。对症治疗是为缓解毒物引起的主要症状，促进人体功能恢复。支持治疗能提高患者抗病能力，促使早日恢复健康。

（三）职业卫生标准

1. 意义　职业毒理学工作者的首要任务就是防止职业病的发生。控制、减弱工业化学物的浓度，是预防职业损害的重要环节。但在目前水平，至少在相当长一段时间内，由于经济、技术可行性的限制，不可能完全消除化学物对人体的危害，只能将其控制在一定水平内。因此，就要有一个标准，即规定一个接触限制（exposure limit），作为衡量作业卫生状况的尺度，实施职业卫生监督的依据，改善劳动条件的奋斗目标。对职业环境各方面卫生要求所制定的标准即为职业卫生标准，从职业毒理学的角度来讲，最重要的是车间空气中有害物质接触限值。

2. 车间空气中有害物质接触限值　车间空气中有害物质接触限值是为保护作业人员健康而规定的，其具体含义和表示方法各国不同，有多种。最高容许浓度（maximum allowable concentration，MAC）在我国、俄罗斯等国家应用，指工作地点化学物质一个工作日内任何时间均不得超过的浓度；在美国使用的有阈限值（threshold limit value，TLV），包括时间加权平均阈限值、短时间接触阈限值及上限值，容许接触水平（permissible exposure level，PEL）等；此外，还有保证健康的职业接触限值，最高容许生物浓度等。

制订车间空气中有毒物质接触限值的依据，一般包括化学物的理化性质、动物实验和人体毒理学资料、现场劳动卫生调查和流行病学调查资料。首先，充分查阅文献资料，如果已有的有关待制订卫生标准的化学物的文献资料不多，先从毒理学实验开始。测毒物毒性的基本数据，如进入途径、LD_{50}、LC_{50}、急性吸入阈浓度，毒作用特点及靶器官，蓄积毒性及体内代谢，有无致畸、致突变、致癌、致敏及迟发性毒作用等；然后通过吸入染毒实验确定慢性毒作用的阈浓

度，再选择一定的安全系数，提出卫生标准的建议值，对建议值进行试行，通过现场卫生学调查和接触者健康状况的动态观察，根据所得结果对建议值的安全性和可行性加以验证；最后定出既安全、合理又切实可靠的数据。

对有害物质制订接触限值的过程，其实质就是从质和量两个方面深入研究化学物与机体之间的作用关系，从而求得一个合理的安全界限。换言之，就是要在充分掌握化学物有害作用的基础上，阐明其作用量与机体反应性质、程度及在某一群体中所占比例的关系，即接触水平-反应关系。

制订车间空气中化学物接触限值的原则，“是在保障健康的前提下，做到经济合理，技术可行”，即安全性与可行性相结合，从我国实际情况出发，做到保障工人身体健康，促进生产发展。如果接触限值不能保障工人健康，则无意义，所以安全性是第一位的。

（四）毒物监测

毒物监测是职业毒理学的一个重要环节。通过毒物监测，可以掌握生产环境中毒物的性质、浓度及其在时间、空间的分布情况；估计人体的接触水平，为研究接触水平与健康状况的关系提供基础数据；检查生产环境的卫生质量，评价劳动条件是否符合卫生标准的要求；监督有关劳动卫生和劳动保护法规的贯彻执行情况，鉴定预防措施效果；为控制毒物及制订、修订卫生标准和工作计划提供依据。

毒物监测包括空气中化学因素的监测、皮肤化学物污染量的测定及生物学监测。测定空气中化学物的浓度或是测定皮肤污染量都不能真正反映工人体内实际摄入量或吸收量，生物学监测则可以弥补这个缺陷，它可以用来评价生产环境中化学物吸收后在体内的负荷水平，并检测早期生物学效应。

（五）危险度评价

危险度评定(risk assessment)是毒理学的一个重要概念和工作内容，在职业毒理学中同样也具有重要的地位，是职业卫生决策的主要依据。由于危险度评定使卫生决策具有充分的科学依据，因而可使卫生决策更为客观，从而减少工作中的失误。

工业化学物的危险度评定是通过环境监测、健康监护、流行病学调查研究以及实验室测试等手段，对化学物的潜在作用进行定性和定量的鉴定和评价，推断其造成损害所需的剂量和条件；探讨其损害性质，并估测其在一般接触条件下可能造成损害的程度和概率。目的在于寻求可接受的危险度，最大限度地减少化学物的不良作用，也为预测化学物的潜在作用，实施有效预防提供依据。

工业化学物危险度评定的内容可概括为 5 个部分：①化学物对机体损害作用的评定；②接触剂量与损害程度的关系；③工人实际接触量与接触情况的确定；④对化学物危险度的估计；⑤提出进一步研究的内容。

近年来，国内外在工业化学物危险度评价方面进行大量探索性工作，大致可分为危害因素潜在作用的评价和人群健康损害的评价。工业化学物可能造成损害的危险度涉及多种因素，非常复杂，有待进一步充实与发展，并需要多学科人员通力合作，积极参与。随着作业环境监测技术的改进，低浓度生物效应及早期诊断指标研究的进展，动物实验结果的合理外推，接触水平-反应方面资料的累积以及流行病学调查方法的不断完善，工业化学物质危险度评价工作，必将提高到一个新的水平。

第二节 药物毒理学

一、概述

药物毒理学是毒理学的一个相对年轻的分支,涉及毒理学原理和方法在药学领域的应用,其目的是为了保证药物的安全,体现在新药临床前安全性评价、临床试验及临床合理用药。它是研究药物在一定条件下对生物体的损害作用,并对药物毒性作用进行定性、定量评价以及对靶器官毒性的作用机制研究的一门学科。药物毒理学是从分子生物学、遗传学、解剖学、动物学、病理学、统计学等基础学科发展起来的。它研究的内容包括对药物的一般毒性,特殊毒性以及对靶器官的毒性作用机制研究,通过这些研究为正确评价药物的安全性、危害性提供科学依据,对临床的安全用药具有重要意义。从生物学的观点看,一种药物的毒性是由许多可变因素决定的,并受到多种因素的影响,如药物的理化性质、吸收途径、进入生物体内的转运,转运过程及所产生的毒性反应是否可逆等。此外,毒性反应并不限于一般的反应,在剂量足够大时,几乎所有的药物都产生特殊类型的毒性。所以,通过药物毒理学的研究,可以了解药物的毒性反应,确定药物毒作用的靶组织,进而确定药物毒性作用的机制,还可以确定毒性作用的剂量范围,了解药物的毒性作用是否具有可变性,研究解毒药及药物中毒的解救措施,并且通过对动物实验的重复给药,为阐明药物的毒性作用及疗效机制提供线索,为生命科学研究提供资料。

药物毒理学担负着现有的和新生产的药物对健康影响的安全评价,探讨药物对靶器官的毒性作用机制和对人的危害及防止发生危害的安全剂量。没有这门科学人们就无法去认识对人类健康具有潜在危险的药物。例如,长期服用吗啡后能引起成瘾性中毒,孕妇服用沙利度胺(反应停)后引起畸胎,环磷酰胺既有致突变作用又有致癌作用等。特别是现代新药不断问世的今天,如果没有药物毒理学这门科学对所生产的药物毒性进行全面深入的研究,药政部门是不会受理的。因此,药物毒理学对药物毒性的研究,无论过去、现在和将来对人类的健康仍将起到重要和不可缺少的作用。

药物毒理学的研究内容包括 3 个方面:①药物对靶器官毒性作用机制的研究,包括药物对肝脏、肾脏、神经、内分泌、呼吸系统及胃肠道的毒性作用等;②对药物进行一般毒性实验的研究,包括急性毒性实验、长期毒性实验和局部毒性实验等;③对药物进行特殊毒性实验的研究,包括生殖毒性实验(一般生殖实验、致畸实验、围生期实验)、致突变实验、致癌实验、药物依赖实验及毒性实验中的病理学检查。

药物毒理学研究的最终目的是研究药物对人的损害作用(毒性作用)及其机制,但在人体的研究实际上难以实现,因此,药物毒理学主要是借助于对动物的毒性实验,再外推到人。由于动物,特别是哺乳动物和人体在解剖、生理和生化代谢过程方面有很多相似之处,这就是利用动物实验的结果可以作为外推到人的一定基础。

药物毒理学的研究方法以动物实验为主,也可用体内实验和体外实验。体内实验多采用哺乳动物,如大鼠、小鼠、豚鼠、家兔、仓鼠、狗和猴等。实验时严格控制实验条件,使实验动物接受药物,然后观察药物引起的各种功能或形态的变化。检测药物的一般毒性,多在整体动物中进行,如急性毒性实验、长期毒性实验、局部毒性实验、致癌实验等。哺乳动物体内实验是药

物毒理学的基本研究方法。体外实验是利用游离器官、培养的细胞或细胞器进行药物毒理学研究，多用于药物对机体急性毒作用的筛选、作用机制和代谢转化过程的深入观察研究。体内和体外实验各有其优点和局限性，应主要根据实验的目的要求，采用最适当的方法，并相互验证。

二、药物对机体毒性作用的一般规律

种类繁多的药物，它们对机体所呈现的毒性作用是多方面的。经长期的实验研究方法的发展，人们对药物对机体毒性作用的一般规律及作用机制到影响其毒性作用的一些因素，都有了新的和进一步的认识。药物毒性作用机制主要包括以下 5 个方面。

1. *抑制氧的吸收、运输和利用* 有些物质对机体的毒性的产生，是由于干扰了机体的需氧生理过程，而氧是维持机体正常生命活动的必需物质。

2. *抑制酶系统活性而产生损害作用* 进入机体的药物，有些对酶系统具有直接作用，或影响其生成，或改变它的活性，从而使酶所参与的生化反应受到种种影响，使机体有关的生理功能受到干扰，这是许多药物对机体产生毒性作用的原因。

3. *对组织细胞结构的损伤作用* 有些药物对机体的毒性并不首先引起细胞功能的改变，而是直接损伤组织细胞结构，如青霉素、普卡霉素等对肝脏有毒性，是由于这些药物对肝细胞引起的化学损伤，从而使肝组织出现变性和坏死。细胞内所含的酶被释放到血液中，如谷丙转氨酶此时就可以见到大量的增加。

4. *干扰代谢功能* 有些药物对机体的代谢过程可产生多种影响，破坏其动态平衡，使相应的生理功能受到损害，这是药物呈现毒性作用较为常见的。

5. *影响免疫功能* 药物对机体免疫功能的影响或分为两个方面：一方面是诱导兴奋，出现超出寻常的免疫反应，如变态反应、自身免疫反应，这些过强的免疫反应，可对机体产生程度不同的损害，重者可危及生命；另一方面则是引起消退抑制，使免疫监视功能低下，导致机体对感染或其他疾病抵抗能力下降。

三、影响药物毒性作用的因素

在对新药进行毒性评价时，可能受多方面因素的干扰，从而影响实验的准确性，严重时甚至可能使实验结果失真，导致错误结论。毒性作用的因素总的来说可以归结为 5 个方面，即药物的理化性质、受试动物的种属及个体差异、赋形剂、给药途径、环境因素等。

药物在进入机体后发挥毒性效应，可以说是由于药物对机体内某种生物大分子(如酶与受体的互相作用)，或者药物改变了生物大分子所在的微环境(如一些脂溶性药物或掺入膜脂质，从而使细胞膜镶嵌蛋白活性所依赖的脂环境改变)，进而使正常信息传递系统紊乱，结果发生毒性反应。所以说药物的化学结构决定其物理、化学性质，而其理化性质又决定该物质的生物活性(毒性)，同一类药物，由于结构(包括取代基)不同，其毒性也有很大差异。药物的脂水分配系数、电离度、溶解度、光学异构及基团的电荷性都与毒性有关。

当以人体反应为衡量标准将动物实验结果与临床试验结果相比较时，可以出现 4 种情况：真阳性、真阴性、假阳性、假阴性。前两者表示在动物实验时获得的药物毒性作用与人体试用结果基本相同，体现出药物反应的种属相似性，这表明了动物毒性实验的实用价值。但在这种情况下，一般也主要反映在定性上，在敏感程度上肯定存在差异，永远不能将一种动物得到的研究结果完全搬到另一种动物或人上。后两种情况显示了药物反应的种属差异性，即在动物

中出现的毒性反应在人体中并不存在(假阳性)或在动物中未出现的毒性反应而在人体中产生了毒性反应(假阴性)。所以,不能期望从动物实验中得到的信息来指导临床使用。除了动物的种属差异外,实验动物个体因素和动物疾病因素与毒性效应也有关系。如不同性别的动物对药物的敏感性不同,一般雌性动物较雄性动物敏感;肝脏疾病、肾脏疾病能影响药物的代谢和毒性作用。

四、药物的毒性作用

从药理毒理学的角度而言,药物的毒性作用包括以下6种:①毒性反应(toxic reaction):在治疗剂量下不出现,仅在剂量过大、用药时间过长或体内药物蓄积过多时才出现的反应,如利福平;②变态反应(allergic reaction):机体对药物的不正常免疫反应,非肽类药物作为半抗原与机体蛋白质结合后,经过敏化过程而发生的反应。也称过敏反应(hypersensitive reaction),其特点是因药因人而异,与药物效应及剂量无关,而且用药理拮抗药解救无效,如青霉素;③特异质反应(idiosyncrasy):用药者有先天性遗传异常,对某些药物反应特别敏感,出现的反应性质可能与常人不同,由药理遗传异常所致。其与药物的固有药理作用基本一致,严重程度与剂量成比例。如抗疟药伯氨喹引起葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏者溶血性贫血,高铁血红蛋白血症。④致癌性(carcinogenesis),属于长期用药产生的毒性,可以是迟发效应,已被列入致癌物或能致癌物的有己烯雌酚、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、右旋糖酐铁、非那西丁、羟甲烯龙等;⑤生殖毒性和发育毒性,生殖毒性是针对育龄人群,用药后对生殖系统及与生育相关的神经或内分泌系统产生的毒性,发育毒性则是关注药物对胚胎的影响,特别是药物的致畸毒性。⑥致突变与遗传毒性,指药物损伤遗传物质而发生突变作用,产生对人类本身(致癌毒性)及后代的影响(致畸毒性),如染色体畸变(数目及形态),遗传物质损伤(碱基取代和移码突变)等。

五、新药临床前毒理学评价

随着医药工业的迅猛发展,新药层出不穷,药物的数量日益繁多。因此,如何评价一个新药的安全性问题,已引起了世界各国药物毒理学家们的极大关注。新药评价是一个极为复杂的系统工程,是医学科学中一项古老而新颖的工作,它既有很强的理论,又有很强的实践意义。任何一个药物过渡到临床,必须进行临床前的药物毒理学评价。药物毒理学评价任何一种药物毒性的目的,最终都是为了估计或推测它对接触人群的危险度。因此,一种新药过渡到临床首先要保证药物的安全和有效。保证安全则是临床前药物毒理学研究的主要课题。通过新药临床前毒理学研究,一方面可以提供药物的安全剂量范围,另一方面可以提供药物的毒性表现和毒性作用部位。所以,新药临床毒理学研究可以为新药临床用药的安全性提供试验依据,并为临床毒副反应监测提供重要信息。

目前新药临床前安全性评价,都是根据各国药政部门的规范进行毒理学研究,根据新化合物实体拟用于临床的适应证、剂型和用药途径等,确定毒理学研究的项目。新药临床前药理毒理研究的主要内容有11项:主要药效学实验,一般药理实验,急性毒性实验,长期毒性实验,过敏性、溶血性、刺激性等特殊安全性研究,复方制剂中多成分的相互影响实验,致突变实验,生殖毒性实验,致癌实验,依赖性实验,动物药代动力学实验。新药临床前毒理学研究应在GLP实验室进行,在完成规定的项目后,对全部资料进行评价,并提交药政管理部门评审。

在对新药进行毒性实验时,可能受到多方面因素的干扰。严重时甚至可能使实验结果失

真，导致错误的结论。长期以来，药物毒理学家为了认识这些影响因素以便排除他们的干扰而做了大量工作，积累了大量的资料，根据这些资料可以将影响因素归纳为以下 3 个方面：①与被试物有关的因素，如受试药物本身的物理性状，所含杂质，溶媒或赋形剂，以及给药途径和方法等；②实验动物的内在因素，如实验动物的种、株、性别、年龄及体重等内在因素；③影响动物内因改变机体反应性的外界因素，如环境温度与湿度，对动物的料理、季节及照明节律等，这些因素都不同程度地影响对所试药物的毒性反应。

第三节 生态毒理学

一、概述

1969 年，René Truhaut 首次将生态毒理学作为一个学科提出，试图综合两个完全不同的主题：生态学（研究生物丰度与分布和环境相互关系的学科）和毒理学（通常是研究外源性化学物质对人类有害效应的学科）。毒理学研究的生物集合有限，而生态毒理学评价化合物的作用对象不仅是个体，也包括种群和整个生态系统。自诞生以来，生态毒理学的定义有一个发展的过程。1978 年 Butler 指出，生态毒理学研究有关化学、物理因素对活生物体的毒效应，尤其是对指定生态系统中种群和群落毒效应，包括这些因素的转移途径和它们与环境的相互作用。Rodolph 和 Boje 于 1986 年定义生态毒理学为通过回顾性的调查数据和预测性的特定试验研究对动植物的危害。Levin 等（1989 年）认为生态毒理学是探索化合物对生态系统影响的科学。Walker 等（2001 年）最近概括为生态毒理学是研究化合物对生态系统有害效应的学科。

生态毒理学是毒理学的分支，是研究化学因子和物理因子对规定的生态系统内所有生物体特别是种群和种落的毒效应，也包括这些因子的传播路径和环境的交互作用。由于生物种类繁多，而且毒性终点各异，如生长缓慢、运动模式改变、繁殖效应和死亡等。生态毒理学研究十分复杂，为了减少实验数量，科学家选择不同环境介质中的敏感物种为代表，并使实验标准化。生态毒理学是较新的学科，它正在发展，实验条件逐渐向真实性改进。将生态毒性用于风险评价是生态毒理学迅速发展的一个方向。生态毒理学的研究在实验室和野外两个方面进行，其目标是整合两个方面的研究结果。使用实验室和野外数据来了解健康生物体内外的复杂参数集合，对风险评价是非常关键的。

生态毒理学有 3 个主要目标：①获得风险评价和环境管理的数据；②研发和释放新化合物要达到的法律要求；③发展相关的实验和理论原则，增进人们对化合物在生命系统中的行为和效应的了解。为了实现这些目标，生态毒理学的主要研究领域有 7 个方面：①污染物的环境分布、环境输入、运动、累积和转化；②生物效应；③在个体水平，毒物对生物的生化、分子、生理结构和功能的干扰，这些干扰有群落的生态系统的结果；④在种群水平，检测个体数量变化，基因频率或生态系统功能因污染而引发的变化；⑤使用生物标志以确定自然种群是否面临风险或需要进一步调查；⑥通过标准毒性实验服务于化学品毒性控制法规和注册。这部分实验通常是室内标准化实验，也越来越多地采用模拟生态系统实验，在农药毒性控制中还采取野外实验的方法；⑦特殊化合物的危害和风险评价，如对生物技术的环境安全性研究和纳米材料的毒理学评价都是生态毒理学新的热点。

生态毒理学是随着生态环境的日益突出而产生的新兴学科，其核心部分是生态毒理效应，

即有毒、有害物质对生命有机体危害的程度与范围的研究以及剂量-效应关系的确定。生态监测和生物检测是进行生态毒理效应研究的两种技术手段及方法。它用多学科(生态学、毒理学、化学、医学、数学和生物技术)理论来解答各种复杂的生态环境问题,解释生态系统中污染物的暴露风险;它用于支持环境政策、法律、标准和污染控制方法。在这种意义上,生态毒理学不仅是一门科学,而且是污染防治中应用性很强的环境保护基本工具。

二、环境毒物与生态毒理效应

随着工农业生产的不断发展,城镇建设规模的日益扩大以及局部地区持续的战争,环境污染日趋严重。似乎以化学品的环境污染更为突出。据报道,在全球水平上目前约有 10 万种合成化学品释放进入环境而成为环境毒物,并且以每年 1 000 种新的化合物产生的速度在增加。由于制造和运输过程中的事故性泄漏和不合理使用,加剧了化学品对环境污染及其对生态系统的暴露与危害。

(一) 大气污染与大气毒物

在干洁的大气中,痕量气体的组成是微不足道的。但是,当大气环境中,出现了原来没有的微量物质,其数量和持续时间,都有可能成为对人、动物、植物及物品、材料产生不利影响和危害,成为大气毒物。当大气中这些原来没有的微量物质浓度达到有害程度,以致破坏生态系统和人类正常生存和发展的条件,对人或物造成危害的现象,即为大气污染。

造成大气污染的原因,既有自然因素又有人为因素,尤其是人为因素,如工业燃烧、生活废气、汽车尾气和核爆炸等。随着人类经济活动和工农业生产的迅速发展,在大量消耗能源的同时,也将大量的废气、烟尘物质排入大气环境,严重影响了大气环境的质量,特别是在人口稠密的城市和工业区域。

大气污染主要通过 3 条基本途径危害生态系统的可持续发展和生物的生存和发育:使生物中毒或枯竭死亡;减缓生物的正常发育;降低生物对病虫害的抗御能力。大气污染物对动物的毒理效应,主要是呼吸道感染和食用了被大气污染的食物,其中以砷、氟、铅、钼等的危害最大。大气污染使动物体质变弱,以致死亡。植物组织结构受到伤害,导致植物枯萎,直至死亡。各种有害气体中,二氧化硫、氯气和氟化氢等对植物的危害最大。大气污染还通过酸雨形式杀死微生物,使土壤酸化,降低土壤肥力,危害了农作物和森林生态系统。

(二) 水体污染与水环境毒理

所谓水污染,是指水体因某种具有不良反应效应物质的介入,而导致其化学、物理、生物或者放射性等方面特征的改变,从而影响水的有效作用,危害人体健康或者破坏生态安全,造成水质恶化的现象。时至今日,约有 10 万种以上的化学品得到应用,并不同程度地进入水中而成为水环境毒物,构成对水体的污染。水污染可根据污染杂质的不同,主要分为化学性污染、物理性污染和生物性污染三大类。其中,被认为尤其有害的化学品主要有:有机卤化合物;有机磷化合物;致癌、致突变和致畸物质;汞及其化合物;镉及其化合物;持久性矿物油和烃类化合物;漂浮或以悬浮液形式存在的持久性合成物质,以及干扰水的使用功能的持久性、毒性和生物积累放大的物质。

影响内陆水体最通常见的有毒无机物质为铜、铅、镍、锌、铬等重金属,可溶性硫化物以及溶解性气体氨和氯等。当这些物质少量存在,或者由于污水随意排放,就会使鱼类和底栖生物死亡。许多生物只在非常窄的 pH 值范围能够适应生长,这些水生植物和动物对水中环境酸

碱度适当的变化都是敏感的。由于环境长期作用，那些适应的生物得以生长和繁殖，而那些不适应的生物最终灭绝。

(三) 土壤污染及其环境毒理

土壤不仅是农业生产的基础，而且是人类环境的重要组成部分。这个具有肥力、能够生长植物的地球陆地疏松表层一直以来就被作为农业主要生产资料、农业劳动所改造对象。土壤与人类的关系是生存层次上的关系，随着人口的迅速增长和城市化程度、工商业化水平的不断提高，在现有的甚至是不断缩水的可耕作土壤资源上进行原始的农业化操作已远远不能满足人类社会的需求，因此，也就不可避免通过技术手段提高土壤生产力，而这些局部强烈地球化学行为和人为活动带来的直接后果就是土壤环境污染。

多方面的资料表明，土壤中存在的环境毒物，包括了自然界几乎所有存在的物质，其中以重金属、石油烃、持久性有机污染物(POPs)、其他工业化学品、富营养的废弃物、放射性核素和致病生物等为主。论及污染源，也是包罗万象，涉及工业污染源、农业污染源、生活污染源、商业污染源以及其他污染源。

农药能够防治病虫害，调节植物生长，抑制杂草繁殖，但施用不当，也会造成土壤环境污染，并可使植物产生急性毒害或慢性毒害效应。有时农药虽然杀死了某种害虫，但由于同时杀死了它的天敌，反而使这种害虫大量繁殖起来。

农药污染对土壤生态系统的破坏，具体表现为以下 3 个方面：①使生物相日趋贫乏，群落结构不断简化；②使生态条件改变，引起生物种群发生变化；③使生物相不稳定，反馈机制失调。

三、生态毒理学中的生物标志物

近年来，在评价环境中化合物潜在的有害效应中使用生物标志物的兴趣已呈上升趋势。在理论上，生物标志物的生物反应类型的范围从分子到完整的生物体，种群或群落结构效应，直至生态系统的结构和功能。生物标志物已被广泛地应用于证明和定量环境污染物的暴露和效应。作为暴露的监测，生物标志物的优势在于仅对生物有效的污染物进行定量。有大量的有关水生生物的标志物的文献，相对而言，生物标志物用于陆地土壤无脊椎动物较少。细胞水平的生物标志物是该领域的先锋，目前大部分的生物标志物技术是在细胞水平上产生的。在过去的 10 年中，生物标志物领域发展迅速，涵盖了较传统的暴露的生化测定、效应剂量、反应或灵敏度等。例如，血铅的水平、血清 ALA 脱氢酶、肝毒性的血清酶标记等。总体上，一种生物标志物可以被认为是一种生物对一种或多种化合物的生物学反应，有的也是毒性效应，它能衡量对化合物的暴露水平。

由于新的分析技术的应用，主要是以分子生物学技术为基础，使得测定暴露效应剂量、反应和灵敏度的新的标记的发展不断向前，如医学毒理学中使用的细胞和动物模型。在毒理学风险评价中，生物标志物已被证实并有效。然而，生物标志物的生态毒理学的作用是估计或是预测在较高的组织结构水平上的生态伤害，生物效应发生的水平比简单生物化学测量反应的水平更高。选择在某一典型的生物体反应，从单一生物化学变化外推到能理解的具有生态学意义的测定参数，这一测量步骤存在一个较大的障碍。然而，如果它确实能得出令人满意的结论，它将提供一个潜在的有力的立法工具，能够客观地定义污染排放和环境效应。

生态毒理学的最终目标之一是预测或评价由于环境污染物导致的生态效应的风险。风险评价程序分别由暴露评价和效应评价组成。在这个评价过程中最大的不确定性来源于实验室

的结果外推到野外。这样一个外推方法似乎理论上是不可能的，因为一个生态系统的基本特征不是由实验室内单个受试物种混合构成。为迎接这个挑战，在生物标志物与生态终点之间（如死亡率、繁殖率、生长损伤或其他生态学的重要功能）建立明确的具有生态毒理学意义的联系是重要的。

近年来，随着生物技术的发展，出现了一些新的生物标志物方法，如 DNA 指纹技术、微生物群落特征的环境状况指示等。

四、生态危险度评定

生态危险度评定（ecological risk assessment）是评估由于接触暴露于环境压力因素对生态受体造成危害的可能性及其人危害程度的过程。在生态危险度评定中，环境中各种可能危害生态系统的因素（物理、化学、生物）统称为压力因素或生态压力因素，生态受体（ecological receptor）是指暴露于压力因素的各种植物、动物以及其他生态资源。生态危险度评定与环境毒理学紧密联系点，是在当今环境科学众多学科中发展和扩充最为迅速的一个新兴的分支学科。

生态危险度评定是在美国环境保护署（EPA）的框架或指导原则基础上延伸而成的，包括三个阶段和若干具体步骤。现以美国最近公布的指导原则为基础，对生态危险度评定的基本过程作一简要介绍。

1. *问题形成阶段* 生态危险度评定的第一个阶段，主要目的是确定研究方向、研究范围和时限，包括收集已有资料、评估研究观察终点、建立概念模型、拟定分析计划等步骤。在这个阶段，评定专业人员与危险度管理决策人员之间的联系、交流和讨论十分重要，既往资料的收集和评价是问题展开阶段的一项重要内容。按照美国 EPA 的解释、收集、整理和评价已有的各种资料，包括接触源和接触特征、生态系统和社区的有关特征以及生态效应等方面的资料，可以减少工作量和某些不必要的重复。但是，由于我国生态危险度评定工作开展得还很少，故这一步骤应充分参考国外的有关资料和国内的相关研究。使整个危险度评定方案的设计更加合理。

问题形成阶段的最后一步是制订出一个详细的危险度分析计划，这个分析计划应该具体地说明所有的测量终点及其意义，整个生态危险度评定过程中所产生的各种数据和资料，并列出这些数据资料收集的方法、途径及其具体过程。

2. *分析阶段* 生态危险度的分析阶段主要包括两大部分工作：接触评定和生态效应评定。接触评定包括 3 个具体步骤：①评估生态受体可能接触暴露于压力因素的途径，即接触暴露途径。②评估接触压力因素的频率、程度和持续时间，以进一步确定压力因素与接触途径之间的联系是否完全确立。换言之，是要肯定生态受体确实接触暴露于该压力因素。生态危险度是由生态受体接触暴露于压力因素所致，两者缺一不可。没有压力因素或生态受体没有接触暴露，生态危险度就不可能存在。因此，如果危险度评估发现接触暴露途径并不能完全肯定，就不必继续进行有关的生态危险度评定。生态效应评定是分析阶段的另一项重要内容，可能需要进行某些实验室和现场研究。③描述处于潜在危害的生态系统及生态受体的特征。

3. *危险度特征阶段* 生态危险度评定过程的最后一个阶段，主要包括 3 个步骤：①危险度描述，是用文字详细地说明生态压力因素具有的危害的类型，受到压力因素危害的生态主体，以及可能影响压力因素危害作用的因素等。压力因素危害的类型可以是受到危害的生态受体繁殖能力丧失、发育和行为异常、生长或增长迟缓等。在危险度描述部分应尽可能详细地

描述压力因素是如何作用于生态受体以致引起生态有害效应的，为什么生态受体会受到压力因素的危害包括受体如何接触暴露于压力因素，为何会发生接触暴露，以及在哪些接触/暴露条件下会引起受体的有害影响等。②危险度评估，是把上述危害进一步定量地描述说明，即评估说明这种危害有多大或者说有多少出现的机会。③不肯定性分析，指评定中那些尚不知道或没有把握的影响危害作用的因素。不肯定性分析是评定者用文字描述记录危险度评定的各种不肯定性，以及这些不肯定性可能对评定结果造成的影响。常用的不肯定性分析的方法是分类分析，即把各个环节或过程分门别类地具体分析。

第四节　其 他 分 支

一、临床毒理学

临床毒理学(clinical toxicology)是由毒理学与临床医学相互交叉、渗透衍生而成，从临床角度研究中毒与解毒的一门学科，主要研究中毒的临床表现及其发生发展规律、诊断和治疗方法，研究对象为中毒患者及高危接触人群，其主要任务是阐明中毒临床表现的规律及其机制，为中毒的早期诊断、急救和治疗提供有效的防治措施，为防治药源性疾病、职业中毒和事故性中毒提供科学依据，以降低中毒对健康的损害及其死亡率。

(一) 毒理学在临床医学中的应用

毒理学的方法和资料为临床工作者全面认识中毒和解毒的过程及其特点提供方法和依据。随着毒理学研究的不断深入，对毒物的危害表现和机制的认识进一步提高，这为提高临床诊断和治疗水平提供依据。例如，从毒理学资料中可得知毒物进入机体的可能途径。进入机体的途径不同，临床表现也不同，毒物在动物体内代谢及排泄等资料，可作为测定人体生物材料(血、尿、头发、指甲等)中的毒物或其代谢产物含量时的参考，并为估计人体的毒物吸收量提供依据。探索中毒机制，尤其是以新方法、新理论来研究毒作用时，可为临床提供新的或特异性的诊断指标。毒理学动物实验为临床工作提供了很多有价值的资料，是认识化学物(尤其是新化学物)毒性作用的基本途径之一。但是，实验动物与人类在中毒反应方面常存在不同程度的种属差异，所以从动物实验外推到人时，应慎重。

(二) 临床医学在毒理学中的意义

1. *通过临床观察，直接观察毒物对人的毒性*　在人体上直接观察毒物的毒性，比从动物实验外推到人更为重要。例如，仔细询问中毒病例的病史，可以估计中毒的剂量；从经常的健康监护工作中，积累毒物接触水平与健康状况资料，可以获得人的剂量-反应关系，为制订或修订卫生标准提供依据。

2. *确定动物实验不能复制的病变*　有些毒物所致的病变在动物实验不能复制，必须直接对人进行观察。如三氯乙烯药疹样皮炎，不能复制动物模型，必须对患者进行研究。有些药物的毒副作用，在动物实验中也不能预测，必须在使用过程中仔细观察，认真总结经验，以全面了解其发生毒副作用的条件，才能预防药源性中毒事故。

3. *观察低剂量长期作用的影响*　动物实验资料多数为较高剂量的作用在短时间内的观察结果，对于低剂量长期作用于人体的资料，需通过对人体直接观察取得。例如，空气中二硫化碳浓度控制在 50 mg/m^3 以下时，虽可防止精神障碍和多发神经炎，但经长期系统观察，结

合流行病学分析，发现这一尝试可引起长期接触者心血管系统的损害。因此，通过经常性健康监护，长期积累资料，不仅可为制订、修订卫生标准提供依据，还有助于制订职业病的诊断标准和规定就业禁忌证及新工人体检要求等。

4. 尸检积累资料　对中毒后积极抢救无效而死亡的病例，应进行尸体剖验，为查明病因、了解病理特点和进一步探求诊断、防治方法提供有价值的资料，积累这些死亡病例的病理学资料是验证毒理学动物实验结果的最可靠证据。

5. 临床工作中的毒理学试验　如新药在完成临床前毒理学安全性评价后，按新药上市前各期临床试验中符合《药物临床试验质量管理规范》(GCP)要求的安全性规范方法进行试验，这是新药上市的必备条件；又如为检验致敏物，需在临床对人体进行斑贴试验。

(三) 中毒病人治疗的临床策略

中毒病人的治疗通常在急诊室进行，但也可能在一些特殊环境下，如战场、工作场所、家里或街上进行，这些统称为院外治疗。它对中毒病人的抢救成功率会有重要影响。经验表明，中毒病人的救治最好应遵照一套完整的方法和步骤以获得最佳效果。急诊室抢救中毒病人通常采用的步骤如下。

1. 维持病人的生命体征　使其处于稳定状态，稳定严重中毒病人包括支持呼吸、心跳和给氧，具体操作详见急诊手册。

2. 急性中毒诊断　首先需收集病史，尽可能了解吞服的物质及其数量或接触的毒物、浓度和时间；然后通过全面体检评价病人的状况，对其精神状态要定级；进行实验室毒物检测，通过检测可以帮助确定诊断，评估病情程度和预后，并指导采用特异性拮抗剂治疗；辅助检查，如X线检查、心电图检查等。

3. 防止毒物继续吸收　吞服毒物、吸入或受毒物污染的病人，在抢救时要防止毒物继续吸收，以最大限度减少进入全身血循环的毒物量。吸入毒物者，应立即将受害者移离毒物环境，保证通气功能和给氧；皮肤污染者要脱去污染的衣服，用水和肥皂清洗，注意不要引起皮肤擦伤；吞服的毒物常采用催吐、洗胃及口服活性炭防止继续吸收。

4. 促使毒物的排出　这是在毒物吸收入全身血循环后采取的治疗措施。有多种方法可以使用，包括碱化尿液、血液透析、血灌注、血液滤过、血浆置换或换血和多次口服活性炭等。

5. 给予解毒治疗　常见解毒剂有金属解毒剂、高铁血红蛋白解毒剂、氰化物解毒剂、有机磷农药解毒剂等。在医院急诊科最简单的解毒剂就是氧气，如高压氧治疗CO中毒；阿托品治疗有机磷中毒；二巯基丙醇治疗砷及金属中毒；纳洛酮治疗阿片类毒品药物中毒，羟钴胺素治疗氰化物中毒，亚甲蓝用于苯的氨基、硝基化合物引起的高铁血红蛋白血症治疗。

6. 支持措施和临床追踪　对症治疗，包括消除或减轻主要系统或脏器的中毒病变，如脑水肿、肺水肿或肝肾损害等；使用非特异性拮抗药，如糖皮质激素、含巯基药物、抗自由基药物等；维持体内环境平衡，维持水、电解质、酸碱平衡，纠正缺氧状态等重要器官的功能，促进康复。

二、法医毒理学

中毒一直是法医学的主要研究内容之一，法医毒理学是一门为法律服务的法医分支学科。在我国，从生物检材中分离、纯化、分析研究、鉴定毒物的一门学科，称为法医毒物分析，也叫法医化学。这是运用分析化学、药物化学和毒理学等相关学科的理论和技术，提供与法律有关的死亡、中毒和药物滥用的法医学证据的学科，其研究和检测的对象主要为人体，除着重揭露以

毒物作为暴力手段对人体造成的危害、为侦破和审理中毒案件提供线索和证据外，同时也能给临床医学实践提供诊断和治疗的依据，还能对有关职能部门的毒物管理和中毒防治问题提出建议和咨询，并有助于有关毒物管理和中毒防范的立法。

法医毒物分析的任务是对中毒事件(案件)中可能有关的毒物进行分析研究，判明是否存在毒物及其与事件的关系，为澄清当事人在事件中是否负有法律责任提供证据，为涉及毒物的违法案件提供侦破线索和犯罪证据。一些案件，如死因不明但怀疑有中毒情节、投毒谋杀、麻醉抢劫、强奸、酒后驾车、生活意外等案件都需要做法医毒物分析。

毒物分析常用的检材包括在现场勘查或侦查工作中发现的检材，如剩余饮食物、药物、中药药渣等；血液，呕吐物和胃内容物，肝脏、胆汁和其他脏器，尿液，粪便，毛发和指甲，尸体腐泥等。采集的检材应逐件分别用大小合适的洁净容器或适用的包装物装盛，贴上标签或辨别标志并密封，及时送检。毒物分析工作要求细致周密，分析方案切实可行，分析方法科学合理，分析结果准确可靠。首先是接受任务，了解有关案情，之后接受检材，制定检验方案；在正式进行检验之前，要认真处置检材，包括检材的描述、称量、标记、留样及选用；然后进行检材的分离净化，将待检毒物从检材中分离出来，进行分析检验，常用的毒物分析方法有形态学方法、动物实验法、化学分析法、免疫分析法和仪器分析法；最后是毒物分析检验记录与鉴定，所有送请检验或鉴定的事件都应建立检验档案，按规则编号，将检验过程的全部文字材料、图片及能保存的实验结果归档保存备查。

法医毒物分析工作所出具的检验或鉴定结论必须科学、公正和权威，而毒物分析工作检材复杂，操作步骤多，容易使分析结果产生误差，因此进行质量控制，保证结果的准确性十分重要。进行质量控制应该评价所选择的分离净化方法的效能及分析方法的灵敏度、准确性、专属性、检测范围线性及耐用性等。另一方面，质量控制目标的实现还需要对实施毒物分析工作的实验室进行规范化的管理，建立技术和质量管理体系，并实施有效的控制。

三、放射毒理学

(一) 概述

放射毒理学是研究放射性核素对生物体内照射作用规律及防治措施的一门科学，是毒理学的一个分支。放射毒理学与毒理学的学科性质相同，但是有自己的特点：首先它是研究放射性核素所释放的射线或粒子等物理因素的内照射危害即辐射毒性，而非化学毒性。它所用的单位是放射性活度的单位“贝可”和吸收剂量的单位“戈”，它是放射医学的重要组成部分；其次在服务对象上，放射毒理学侧重于核工业、核科学技术的各个领域，它的发展和研究既要服务于又要服从于核能、核科学技术的发展；再次，放射毒理学研究工作手段和方法都离不开辐射剂量和辐射测量技术。正因为如此，放射毒理学与辐射剂量学、辐射测量技术密切相关，后两者的发展促进了放射毒理学由定性研究向定量研究发展。

放射毒理学研究的对象，是可能危害生物机体各种状态或化合物形式的放射性核素。职业性工作者所接触的放射性核素种类繁多，可因工种不同而异。公众所能接触到的放射性核素，亦因所处环境的受污染状况、天然水平、居住生活条件和饮食等情况不同而有差异。放射毒理学研究的主要内容包括：①放射性核素在体内的生物转运(吸收、分布、转移和排出过程)、某些核素的生物转化及其动力学模式；②放射性核素内照射作用的特点，损伤规律和剂量效应关系、时间响应关系，以及某些因素的影响；③减少体内放射性核素的医疗措施，包括阻止吸收和加速排除等。

放射毒理学是放射医学和放射生物学的重要组成部分。它与核物理学、放射化学、辐射剂量学、放射生物学、放射卫生学等有密切的关系，彼此间相互渗透，相互促进。近年来，医学生物学和基础医学新技术的发展，有力地促进了放射毒理学的深入研究。随着核能、核科学技术发展的需要，放射毒理学有待解决的问题，在难度和深度上日趋加大，它的研究不仅有深远的理论意义，而且有重要的实践意义。首先，能为评价放射性核素内照射危险提供依据；其次，为人体内剂量估算和医学处理提供依据；再者，为临床合理使用放射性核素提供依据；最后，为探讨放射生物学效应的机制提供依据。

（二）放射性污染的来源

环境中的放射性污染来源于两方面：天然放射线和人工放射线。人类环境中的天然放射性物质，如地壳中的铀、钍和钾和放射性同位素^{40}钾等，它们不断照射人体。这些物质也可通过食物或呼吸进入人体，使人受到内照射。此外，还有宇宙射线产生的外照射。这些天然辐射源所产生的总辐射水平称为天然放射性本底。人类一直生活在这个环境中，已能适应。

环境中的人工放射线污染主要来自以下几个方面：核武器的使用与实验，如 1945 年美国在日本广岛、长崎投掷原子弹以及以美国和前苏联为主进行过的近千次的大气层、水下、地下核试验，造成全球性的环境放射性污染；核燃料的开采、加工与再处理，核电站的发展及同位素的应用都可以造成放射污染。

（三）放射性污染对人体健康的影响

放射性污染物进入环境后，通过体外照射和体内照射影响人体健康。应该指出，放射性污染对人体的影响是一个非常复杂的效应。当人体受到大剂量照射时，其有害的结果几乎立即可以观察到，这就是急性效应。核武器爆炸、核反应堆意外事故等造成的损伤属急性效应。长期小剂量照射，近期后果十分轻微，有可能在若干年内发现不了，要经过相当长的潜伏期，甚至延续到下一代才能看到明显的有害效果，这就是远期效应，主要指辐射致癌、白血病、白内障、寿命缩短及遗传效应等方面的损害。

四、军事毒理学

（一）概述

军事毒理学(military toxicology)是利用毒理学的概念和方法，从预防医学角度，研究军队战时环境因素和军事作业中外源化学物特别是化学武器的有害作用及机制、防治和急救措施的科学。简言之，它主要研究卫生学范畴的外源化学物和生物物理因素的有害作用、机制和防治措施，属于毒理学的一个分支，与卫生毒理学的研究内容在军事环境因素上有交叉。军事卫生毒理学是适应现代军事斗争、和平时期军队建设和国家经济发展的需要应运而生，是军事毒理学和卫生毒理学的交叉融合发展形成的。

军事卫生毒理学的任务是阐明军事环境因素的有害作用，包括毒性作用的性质、发生的规律及其机制，以及评价此种有害作用的方法，并在此基础上探讨环境因素，特别是外源化学物对机体健康损害的早期生物监测和医学监护及防治的方法，研究预防措施，为制订卫生标准和卫生管理机构决策提供科学依据。军事卫生毒理学的任务、内容主要根据军队实际需要，分别借鉴于军事毒理学和卫生毒理学的主要研究任务和内容。卫生毒理学作为毒理学的一个分支，其主要研究内容和方法是采用一般毒理学基本原理，对军事和与军事相关的卫生学环境作为研究工作的出发点和服务对象，这是军事卫生毒理学区别于其他分支毒理学的重要差异。

(二) 毒物的特殊存在形式——化学武器

化学武器(chemical weapon)是化学战剂、化学弹药及其施放器材的合称。应用各种兵器,如步枪、各型火炮、火箭或导弹发射架、飞机等将毒剂施放至空间或地面,造成一定的浓度或密度用以攻击敌方,从而发挥其战斗作用。化学战剂(chemical warfare agents, CWA)或简称毒剂,是军事对抗中用以杀伤对方有生力量、牵制和扰乱对方军事行动的有毒物质的统称。CWA 是构成化学武器的基本要素。

化学武器致伤特点是由构成化学武器的基本要素——CWA 所决定的。与常规武器比较,有 4 个特点:①毒性作用强;②中毒途径多,化学武器则可能通过毒剂的吸入、接触、误食等多种途径,直接或间接地引起人员中毒;③持续时间长,化学武器的杀伤作用在毒剂施放后不会立即停止损伤,其持续时间取决于 CWA 的特性、袭击方式和规模以及气象、地形等条件;④杀伤范围广,化学袭击后的毒剂蒸气或气溶胶(初生云)随风传播和扩散,使得毒剂的杀伤范围远远超出释放点。

(三) 军事毒理学的发展

由于化学武器在战争中的使用,对参战人员的医学防护成为军事后勤卫生保障的重要研究课题,军事毒理学便由此产生。化学武器大规模使用始于第一次世界大战,使用的毒剂有氯气、光气、双光气、氯化苦、二苯氯胂、氢氰酸、芥子气等多达 40 余种。第二次世界大战期间,在欧洲战场交战双方都加强了化学战的准备,化学武器贮备达到了很高水平,在亚洲战场日本对我国多次使用了化学武器,造成大量人员伤亡。从第二次世界大战结束至今,世界上局部战争和大规模武装冲突不断发生,其中被指控使用化学武器和被证实的有美侵朝战争、美侵越战争等。80 年代初开始的两伊战争,伊拉克在进攻失利、失去主动权的紧急时刻使用化学武器对扭转被动局面、最终实现停火发挥了重要作用。

和平时期,军队的自身建设中也会不断遇到环境因素有害作用的影响,军队还要参加地方经济建设,有许多毒理学的课题有待于攻克。军事卫生毒理学的发展有自身发展的独特趋势,由于军事斗争的复杂性,尚很难作出概括,但是可以肯定地说其发展主要依附于毒理学的发展。

(刘承芸,牛　侨)

第五节　纳米毒理学

纳米毒理学(nanotoxicology, NT)是研究纳米颗粒物对生物体的损害作用、生物学机制、安全性评价和危险性管理的毒理学分支学科。纳米毒理学的研究领域主要包括 3 个方面,即纳米毒理学的描述性研究、机制性研究和管理性研究。这 3 个方面虽然各自独立,却相互影响、相互作用,在纳米粒子危险性评估方面都极其重要。

纳米毒理学既有传统毒理学的一般特征,又有其特殊性。纳米毒理学具体有以下 5 个主要特点:①研究对象不同于传统毒理学的化学性物质,而是纳米级颗粒性物质;②传统毒理学的研究方向是可溶性的物质对机体的危害作用,而纳米毒理学一般将不溶性的粒子对机体的危害作用作为其主要研究方向;③纳米毒理学将粒子的粒径作为影响生物体毒性的主要研

究内容；④纳米毒理学不是从化学的角度阐述生物毒性，而是从粒子的角度诠释研究；⑤纳米毒理学在研究方法和毒性作用机制上与传统毒理学相比存在着显著的不同，例如质量或浓度是传统毒理学用来描述剂量的主要参数，而沿用仅以质量或浓度来描述纳米粒子量-效关系的传统方法研究纳米粒子的纳米毒理学显然不够全面。

一、纳米粒子的特性及其毒性

纳米粒子(nanoparticle, NP)是一类粒径在 1～100 nm 之间的纳米尺度粒子的总称。纳米粒子与一般的基本粒子和化学物质相比具有独特的性质，包括粒子尺寸、尺寸分布、聚集形态、粒子形状、结晶结构、化学组成、表面积、表面化学、表面电荷等，这些与传统毒理学中的常规毒物有本质的区别。因此，纳米粒子在机体损伤和毒性过程中具有自身的特点。

(一) 影响纳米粒子毒性效应的因素

1. 自身特性

(1) pH 面积和尺寸：在 pH 粒子的表面效应和量子效应中以表面效应最为显著。表面效应是指随着纳米粒子的表面积增大，相应的毒性也会逐渐增强。除了纳米粒子的表面效应外，纳米粒子的尺寸效应也是影响其自身特性的重要原因，与直径较大的粒子相比有较大的比表面积，从而造成更大的毒性。

(2) 结构：即使具有同样化学组成的纳米粒子，它们也会因结构不同而具有不同化学属性。因此不同的化学结构组成也同样能够影响纳米粒子对机体的毒性。

(3) 长径比：纳米粒子的长径比决定着纳米粒子的亲水性、亲脂性和表面电荷的功能化集团修饰。长径比大的纳米粒子的毒性和它的持久性相关，纤维的持久性取决于它的分散性和机械属性。

(4) 表面修饰和功能化：纳米粒子的表面通常修饰着一定的功能基团，如表面活性剂、蛋白质、羟基等。当这些功能基团修饰纳米粒子后，会影响其表面的理化性质，改变它的亲水、亲脂、磁性、导电性及化学反应活性。

2. 环境因素

(1) pH：环境因素中，pH、离子强度和电荷通过影响纳米粒子在水体中的聚集与分散过程，进而影响纳米粒子的毒性。

(2) 离子浓度：离子浓度也对纳米粒子胶体的稳定性具有影响。离子浓度越高，纳粒子胶体越易聚集，这是因为水体中高的离子强度通过减弱相近颗粒物之间的静电斥力导致纳米粒子的聚集。

(3) 电荷：环境介质中所带的电荷能够影响纳米粒子的稳定性，在一定条件下，阳离子所带的电荷越高，纳米粒子胶体的稳定性越差，越容易聚集。

(二) 纳米粒子与生态环境之间的关系

纳米粒子进入生态环境的主要途径有以下 3 种：①纳米粒子在工业生产、运输和处理过程中产生的纳米颗粒进入环境；②生活日用品中如化妆品和纺织品等掺杂着纳米尺度的物质，在洗脱过程中能够进入环境；③工业生产中所需的一些纳米粒子的产品，可能随产品的使用、分解进入到大气、水和土壤中。纳米粒子进入到生态环境中后能够从不同的介质中迁移。纳米粒子进入生态环境后，一方面纳米粒子本身具有环境毒性，另一方面纳米粒子对环境中有毒有害污染物有较强的吸附性能，因此会影响污染物迁移转化等环境行为，增强毒性。

（三）纳米粒子与生物体的交互作用

沉积在环境中的纳米粒子，可以通过不同的方式进入到生物体中，进而通过生物体的交互作用在生物圈传递。不同介质中的纳米粒子进入生物体的难易性不同，其中水中的纳米粒子进入生物体是最容易的，因此一些低等的鱼、虾，首先成为纳米粒子进入生物圈的第一宿主。纳米粒子再通过食物链的方式经过不同的宿主最后进入人体中，最终对人体产生毒性作用。在此过程中未被生物体吸收的残余纳米粒子会通过生物体消化、代谢的方式再次进入到环境中。另外，一些低等生物，如寄生虫等，也是纳米粒子进入生物体良好的载体，寄生虫会通过黏附、吸收的方式将纳米粒子带入其宿主的体内，进而促进纳米粒子在生物体内的蓄积，增加纳米粒子的毒性。目前越来越多的研究表明，生物体这种相互作用，已渐渐成为纳米粒子进入生物体的主要途径。

（四）纳米粒子的损伤特性

1. 纳米粒子损伤的隐袭性　发病的隐袭性是纳米粒子损伤的显著特点。纳米粒子致病的隐袭性的原因可能与以下 3 个方面有关：①纳米粒子能够进入机体并能持久存在的数量很少，因此纳米粒子引起的疾病都是散在的或是局部的，较难引起全身性的症状；②纳米粒子具有极强吸附性，能够将致病物质吸附于表面，使其周围致病物质的浓度高于其他地方，容易引起局部病变，但这种局部病变又常常被误认为是吸附的致病物质所致，忽略了纳米粒子的作用；③纳米粒子所致疾病与异物性反应相似，机体对纳米粒子的反应常以增生为主，并不能将其破坏清除，很难引起全身的免疫反应和全身症状，不易被察觉。

2. 纳米粒子损伤的持久性　纳米粒子产生的损伤性往往比一般相对应的较大尺度的粒子和可溶性的化合物更具有持久性。基本粒子的损伤往往是即时的，粒子被组织细胞或生物大分子捕获或湮灭后，其损伤作用也随之消失；化学粒子在损伤过程中一般都可被机体代谢或排出，其损伤作用也将不复存在。然而，纳米粒子尤其是难降解、不溶或难溶的纳米粒子，在体内无法排出，因此其对机体的损伤具有明显的持久性。

3. 纳米粒子的穿透性　纳米粒子具有穿透机体屏障系统的较强能力。一般的基本粒子和化学物质只可以通过呼吸道、消化道、皮肤进入机体，发挥其毒性作用。纳米粒子由于其尺寸较小、表面积较大、表面化学活性较强等特性，几乎可以穿透机体所有的屏障，包括血-脑屏障、胎盘屏障、血眼屏障、气血屏障、血-睾屏障等，进入机体后产生毒性作用。纳米粒子的穿透性与纳米粒子本身的物理特性关系十分密切，粒子的直径越小，粒子之间的凝聚力越弱，形状越规则越容易通过机体的屏障。

（五）纳米粒子在体内的吸收、迁移和代谢

1. 纳米粒子的体内吸收　纳米粒子在体内的吸收是其产生生物效应的重要阶段。纳米粒子进入机体后能够引起局部的急性损伤，这种损伤程度及导致的系统毒性是由纳米粒子在机体的吸收数量决定的。呼吸道、胃肠道和皮肤是纳米粒子暴露于机体的 3 个主要途径。

（1）纳米粒子在肺部的吸收和沉积：呼吸道是纳米粒子进入体内的重要途径。纳米粒子的尺寸、水溶性和表面性质等直接影响吸收位点和强度。纳米粒子的渗透和沉积部位在很大程度上依赖于纳米尺寸。研究表明，纳米粒子的尺寸越小，在肺部的沉积数量越大且沉积部位越深。纳米粒子在呼吸道的靶向区域主要取决于颗粒尺寸的大小。纳米粒子在体内的沉积过程通常包括截留、压紧、沉淀和扩散 4 种方式。在纳米粒子迁移过程中，在与呼吸道表面紧密接触时可被截留。形状较长的纳米粒子易于被呼吸道截留，因为纳米粒子越长，与通道表面接

触的可能性越大。

(2) 纳米粒子在皮肤的渗透和吸收：皮肤是人体的最大器官，也是纳米粒子进入机体的重要途径。在大多数情况下，皮肤屏障都能够有效地阻挡微米颗粒的渗透。然而，皮肤屏障对纳米粒子的阻挡还是有限的。皮肤上分散的汗腺和毛囊是纳米粒子侵入机体进入血液循环的主要突破口。研究表明，纳米粒子的直径大小是其渗透皮肤屏障的关键因素。当然，纳米粒子的皮肤渗透不仅依赖于纳米尺寸，还具有化学依赖性。纳米粒子的化学组成是直接决定其渗透能力的根本因素之一。

(3) 纳米粒子在胃肠道的沉积和吸收：纳米粒子可以直接通过胃肠道的吸收进入机体。此外，某些纳米粒子经过吸入暴露后，可经肺黏膜系统排出，进入胃肠道，通过胃肠道再次吸收而进入机体。环境中蓄积的纳米粒子可以通过植物与生物体的吸收进入生物圈，经食物链的方式，最终进入人体。纳米粒子能够通过含有特殊的肠上皮噬菌细胞(M 细胞)集合的肠淋巴组织(派伊结，Peyer's patches, PP)从肠道内腔迁移进入血液中。纳米粒子的摄入不仅可以通过 PP 的 M 细胞与肠道淋巴细胞的独立囊泡，而且也可通过正常肠上皮细胞摄入。

2. 纳米粒子的迁移和分布　纳米粒子经呼吸系统、皮肤、胃肠道等途径吸收后，可进入血液系统并迅速分布到全身各处。但是，纳米粒子在机体中的迁移途径不仅仅通过血液系统分布全身各个脏器，还可以通过淋巴系统和神经纤维的迁移分布到相应的组织和器官。在传统毒理学研究中，一般的外源性物质在体内的迁移和分布主要受控于血流、外源物质与组织的亲和力和扩散能力。纳米粒子在体内的迁移和分布除了与以上的因素相关外，主要取决于纳米粒子暴露途径和自身的纳米特性。其自身的纳米特性包括粒子的表面性质、粒子的尺寸、进入细胞的渗透能力等。其中，粒子的表面性质越活跃，粒子的尺寸越小，进入细胞的渗透力越大，越有利于纳米粒子在机体内的迁移和分布。

3. 纳米粒子的代谢和排泄　纳米粒子被生物机体吸收后，经过一系列的代谢，大部分粒子都将排出体外。通常，以半衰期参数($t_{1/2}$)来表示，即毒物自体内消除 50%所需的时间。在一般情况下，毒物主要通过尿液、粪便、肺等几种途径自体内排出。肾脏是机体排泄外源性化学物质最为重要的器官，它通过把大量化合物转化成水溶性强的物质，最终以尿液的形式排出体外。另外，粪便也是机体排出外源性化学物质的另一主要途径，对于气体性的物质则主要通过肺部气体交换的形式排出体外。胆汁分泌排泄也是外源化学物及其代谢物排出体外的重要途径，当然也存在其他的排出途径。

(六) 纳米粒子的毒性效应

1. 纳米粒子对心血管系统的毒性效应　人体流行病学研究数据表明，空气中污染的纳米粒子能够引起心血管疾病的发生，同时发现，人类死亡率的增长，尤其是源于心血管疾病的死亡与大气中超细微粒(<100 nm)含量的增长也密切相关。大量证据表明，血液中纳米粒子的存在能够导致血栓栓塞性疾病的危险度增加。其原理可能是由于纳米粒子能够刺激血液中血小板聚集，释放凝血因子，从而引起血栓疾病发生。Peters 等研究了美国波士顿地区心肌梗死患者发病率与环境空气中纳米粒子浓度之间的关系，发现纳米粒子浓度的升高后能够增加发生心肌梗死的危险性。

2. 纳米粒子对呼吸系统的毒性效应　呼吸系统是生物机体与外界环境接触的一个主要界面，是纳米粒子侵入机体的一个重要入口。虽然纳米粒子进入气管、支气管后，可以通过种种体内清除机制，如纤毛柱状上皮的定向运动及巨噬细胞的吞噬作用等，将部分的纳米粒子清除，但大部分纳米粒子可以凭借其独有的纳米特性逃避这些体内的清除机制，并沉积于肺部组

织中。研究表明，空气中的纳米粒子与肺组织接触后能够引起肺部暴露区域炎性细胞的大量浸润，同时还可以导致纳米粒子周围血管血栓的形成、组胺的释放，进而对肺组织产生损伤作用。Lam 等学者将单壁碳纳米粒子滴入小鼠的气管内后发现，单壁碳纳米粒子能够诱发小鼠肺组织肉芽肿及肺间质炎症。同时病变还可以向肺泡间隔延伸，导致呼吸道机械性阻塞、肺功能下降等。目前经过大量的研究表明，纳米粒子的呼吸系统毒性与纳米粒子的形态、粒径大小、表面化学特性等有关。

3. 纳米粒子对神经系统的毒性效应　因为中枢神经系统的神经元再生能力有限，故纳米粒子对神经元的损伤具有不可逆性。虽然血-脑屏障(blood-brain barrier, BBB)可保护神经系统免受毒性物质的侵袭。纳米粒子由于其小尺寸和独特的物理化学特性，可以相对容易地通过血-脑屏障进入中枢神经系统。纳米粒子产生中枢神经损伤的主要途径可以分为以下 3 个方面：①诱发炎症反应。纳米粒子可以以直接和间接的方式引起脑部炎症因子增加，导致脑部炎症反应，进而促使神经功能损伤。②产生自由基。转运到中枢神经系统内的纳米粒子，可通过激活小胶质细胞，导致自由基、炎症因子等神经毒性分子大量表达，导致神经损伤。③直接毒性。纳米粒子在感觉神经内转运的同时，也损伤神经元的正常功能，直接导致脑边缘系统毒性效应。

二、纳米毒理学的研究方法

随着纳米技术和纳米材料的迅速发展和广泛应用，纳米粒子对机体健康的影响逐渐被人们重视。针对纳米产品的层出不穷，如何探讨纳米产品是否对机体及生态环境的毒性作用显得尤为重要。

(一) 纳米粒子的表征研究方法

纳米粒子由于具有尺寸小、表面积大的特性，与普通颗粒相比容易发生聚集。因此，在进行研究之前，首先要对纳米粒子进行预处理，将其分散。一般预处理的过程包括：①纳米粒子的纯化；②粒子悬浮剂(肺吸入暴露途径)的选择；③测定纳米粒子的尺寸、分布；④纳米粒子表面积的测定；⑤建立纳米粒子的尺寸随时间变化的标准曲线；⑥纳米粒子高反应活性保护方法的选择，避免它们与空气或溶剂介质等发生化学反应等。

目前，在进行细胞或动物实验之前，通常选用超声和涡旋的方法将纳米粒子进行分散。测定纳米粒子的尺寸、分布主要通过透射电镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)、扫描隧道显微镜(STM)、扫描电子显微镜(SEM)、低温扫描电镜(Cryo-SEM)、环境扫描电镜等。这些都是纳米尺寸分布和比表面积分析的有力工具。利用这些技术可以获得纳米颗粒的三维数据，不仅能够得到尺寸大小，还能够得到粒子形状、尺寸分布的相关信息。

(二) 纳米粒子在体外细胞毒性作用的研究方法

1. 纳米粒子细胞的摄取和定位检测方法

(1) 透射电镜法：透射电镜(TEM)既可以观察纳米粒子在细胞或组织中的定位，又可以结合光谱分析方法，分析细胞内纳米粒子的组成成分，并且还能够提供纳米粒子摄入和定位相关的详细信息。高分辨率透射电子显微镜(HRTEM)的使用可以确定纳米粒子的晶体结构；电子显微镜偶联分析系统的元素定性分析技术，可确定样品中纳米粒子的化学组成。另外，由于透射电镜生物制品的制备和成像分析耗时长，因此极大地限制了分析的样本量，这些是透射电镜法的局限之处。

(2) 元素分析方法:当纳米粒子的成分含有非体内天然原料成分时,我们可以通过测定细胞内非天然元素的浓度或质量来对纳米粒子的摄取进行定量分析。它是迄今应用最广、发展最快的痕量元素分析技术。优点包括:①适用面广,可以进行多个元素的同步分析;②具有较高的灵敏度和低本底信号,检测限可以达到每升亚纳克水平;③检测和分析速度较快;④放射性核素容量,可提供放射性核素信息等。感应耦合等离子体发射光谱(ICP-AES)也是一种强有力的分析技术,用于细胞摄取的纳米粒子的定量分析。ICP-AES的优势是检出限低(十亿分之一级或以下),精度高,高达5个数量级,动态范围宽。

(3) 荧光光谱法:当可被检测的分子与纳米粒子通过共价或非共价的化学结构结合时,可以通过荧光光谱技术检测痕量的纳米粒子。荧光光谱技术能够定量地评估纳米粒子在细胞的摄取和定位,与ICP-AES分析技术一样,可以通过使用荧光光谱或共聚焦荧光光谱对大量的细胞进行分析,从而达到定量的目的。

2. 纳米粒子对细胞毒性的研究方法

(1) 纳米粒子影响细胞增殖能力的评估方法:细胞还原四唑盐产生甲臜染料的技术是检测细胞繁殖能力最常用的评估方法。这种方法不仅可以测量细胞代谢的情况,还可以分析具有代谢活性细胞的百分比。常用的四唑盐3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5.二苯基四氮唑溴盐(噻唑蓝,MTT),它已经被广泛应用于各种纳米材料的体外毒性研究。

(2) 纳米粒子引起细胞坏死的评估方法:细胞膜完整性的评价是在体外纳米毒理学实验中测定细胞存活常用的表征方法。评价膜完整性典型的方法是:①检测细胞对染料的摄取,如台盼蓝(trypan blue, TB)、中性红(neutral red, NR)和碘化丙啶(propidium iodide, PI);②检测细胞培养介质中活性酶以及乳酸脱氢酶(LDH)的释放量;③TB和PI是活细胞排斥的荷电分子。膜破裂的细胞允许TB进入染色,在605 nm有强烈的吸收。PI进入细胞时,它插入DNA和dsRNA片段,在617 nm具有荧光吸收。NR在生理pH条件下不带电,能够进入活细胞和死亡的细胞。在活细胞中,NR被酸性溶酶体(pH = 4.8)高度质子化、聚集,在540 nm具有强烈的吸收。这些技术比较成熟,结果可重复性很好,能够与流式细胞仪结合进行高通量计数。

(3) 纳米粒子引起细胞凋亡的评估方法:凋亡的评价包括形态改变的观察、膜联蛋白V(annexin-V)方法、DNA laddering技术、Comet(彗星电泳)技术或TUNEL技术。在细胞凋亡过程中,细胞凋亡的主要特征是形态的改变,评价细胞形态学的改变可以通过简单的光学仪器和可视化检测设备完成。但这种方法也有一定的局限性,包括:其无法进行及时、连续的成像而在纳米毒理学中未被广泛应用;此外,误差率较高,它可能将吞噬死亡体的活细胞误认为凋亡的细胞。细胞核内酶解的DNA片段是确认细胞凋亡的另一个特征,因此DNA片段也常被用于细胞凋亡的评估。

(4) 纳米粒子引起DNA损伤的评估方法:DNA laddering技术是评价DNA损伤最古老的技术,它通过分离和荧光标记的方法将细胞中受损的DNA进行量化分析。Comet技术是DNA损伤检测最常规的方法,也称为单细胞凝胶电泳技术。TUNEL技术也是评价DNA损伤的另一技术,它的名字源自末端脱氧核糖核酸转移酶介导的dUTP切口末端标记技术(TDT-mediated dUTP-biotinnick-end labeling),它可以检测DNA中双链破裂的数量。

3. 纳米粒子在体内毒性作用的研究方法

(1) 纳米粒子的毒理学研究的方法

1) 纳米粒子的急性毒性研究:纳米粒子进行毒理学评价的第一步就是观察纳米粒子的急

性毒性实验。进行纳米粒子急性毒性实验的目的是：①得到急性毒性实验的定量估计值 LD_{50}，以便初步了解此纳米粒子的毒性效应；②确定纳米粒子急性毒性的靶器官及中毒表现；③判断纳米粒子的毒作用是否具有可逆性；④为进一步评价纳米粒子的毒性作用提供剂量依据。

2）纳米粒子的刺激性试验：纳米粒子对皮肤和眼睛的刺激性实验是急性毒性实验后所需做的另一重要评价实验，一般用家兔进行。进行皮肤刺激实验时，须将家兔背部毛去除，将纳米粒子制成的膏或糊状涂布于皮肤上，覆盖 4 层纱布。涂敷的面积约 6.5 m^2，每只动物要有 1 个无损皮肤区和 2 个擦伤皮肤区。纳米粒子涂敷时间没有规定的限制，一般为 6～8 小时。皮肤刺激的强度，以红斑、焦痂形成、水肿以及腐蚀作用的积分进行评价。眼刺激性实验可将纳米粒子的悬液滴入或糊状物涂入兔一侧眼睛内，留另一只眼睛作为对照。滴入或涂入后在不同的时间间隔检查兔眼反应。

3）纳米粒子的致敏实验：纳米粒子的皮肤致敏实验目前采用的方法包括 Draize 实验、开放式涂皮实验（open epicutaneous test）、局部封闭涂皮实验（Buehler test）、弗氏完全佐剂实验、最优化实验（optimazation test）、分离佐剂实验（split adjuvant test）和豚鼠最大值实验（guinea pig maximization test）。豚鼠是这些实验首选的受试动物，方法是将受试物质局部涂敷于脱毛备好的皮肤。也可以进行皮内注射，或涂皮和皮内注射结合进行，还可以使用兔免疫佐剂来提高实验的灵敏度。

4）纳米粒子的亚急性毒性实验：对于非药用的纳米粒子，亚急性毒性实验、亚慢性实验及慢性毒性实验可能更具有实际意义。应用纳米粒子的亚急性毒性实验可以获得纳米粒子充分接触的毒性资料，同时为纳米粒子的慢性毒性实验设计提供依据。纳米粒子的亚急性毒性的受试对象可为大鼠、小鼠和犬，具体方法是设 3～4 个剂量组饲喂动物。应用大鼠受试时，每剂量组每种性别一般 10 只动物。若用犬时，一般设 3 个剂量组，每剂量组每种性别 3～4 只，给予受试物 14 天后，进行临床生化和病理组织学检查。

5）纳米粒子的亚慢性毒性实验：亚慢性实验的最主要目的是确定纳米粒子"未观察到有害作用的最大剂量（NOAEL）"并进一步确认在重复染毒情况下，受试纳米粒子毒性作用的靶器官。在亚慢性毒性试验中，我们除了可以得到受试物的 NOAEL 外，还可以获得"观察到有害作用的最小剂量（lowest observed adverse effect level，LOAEL）"。NOAEL 和 LOAEL 这两个数值的确定，在管理纳米毒理学中具有深远的意义。

6）纳米粒子的慢性毒性实验：纳米粒子的慢性毒性实验类似于纳米粒子的亚慢性实验，只是实验期限超过 3 个月。在啮齿类，慢性毒性实验时间一般为 6 个月到 2 年，对非啮齿类通常需要 1 年或更长时间。染毒持续时间在某种程度上取决于人类实际接触时间。如果纳米粒子是一种药物或药物载体，那么慢性实验的期限设为 6 个月就已足够。然而，如果受试的纳米粒子为人类终生接触的物质，那么慢性毒性实验的时间就需要 2 年以上。纳米粒子慢性毒性实验的目的是评价纳米粒子的蓄积毒性和致癌性。

4. 纳米粒子在体内检测的技术方法　除简单的 LD_{50}（实验动物的半数致死剂量）之外，体内纳米粒子毒性研究主要集中在以下 3 个方面：①血清生化学指标变化和细胞数量的变化；②组织形态学的变化；③纳米颗粒总的生物分布。常用检测方法如下。

（1）纳米粒子在体内分布和清除的检测方法：检测纳米粒子在体内的分布主要通过荧光标记或放射性标记、ICP－MS 或 ICP－AES 等方法实施，这些检测方法主要针对活体动物或组织切片，用以阐明纳米颗粒的分布和清除过程。在纳米粒子暴露后，通过检测不同时间点的

排泄和代谢，从而获得纳米粒子的清除率。纳米粒子的定量可以采用 ICP－MS、放射性标记和荧光检测的方法。这取决于所研究纳米颗粒的种类和性质。

（2）核医学与核分析技术对体内纳米粒子的检测：以放射性核素为分析工具的放射性分析技术，其优势包括：①高灵敏度，根据放射性核素和样品条件，检测限可低至 10^{-14} mol，有时甚至低至 10^{-18} mol；②体内易于检测；③可以识别内源性物质和外源性物质；④非破坏性，以及相对简单的检测过程；⑤易于实现定量，而且可以准确测定各个器官或组织的分布；⑥微量放射性核素标记，不会破坏生理平衡过程等。

（3）X 线荧光分析技术对纳米粒子的检测：X 线荧光分析技术（XRF）是一种测定元素含量的非破坏性样品分析方法。其主要特点如下：①可以在同一实验条件中实现从多元素同步分析；②能够应用于各种样品类型；③对主要或痕量元素，具有较低的检测限；④即使对未知样品中元素也可以进行半定量分析；⑤样品制备简单，分析快速、重现性好、费用低。不足的是，由于光源的强度有限，常规商用 XRF 的灵敏度有一定的局限性。但是，我们使用同步辐射 XRF，就可以很容易检测到，因为同步辐射 X 线光源强度比普通光源强几个量级，大大提高了检测灵敏度。

（4）组织学/组织病理学检测技术：组织学的检查是针对暴露动物处死后被固定的组织，以光学显微镜观察组织和细胞形态的变化。组织样品制备的标准程序是首先固定组织/器官，然后石蜡包埋，通过显微镜薄片切片机切成薄片观察。这些薄片可被染料染色，最常用的是 H8E 染色剂或苏木精（染细胞核/核酸成蓝色）和曙红（染细胞质成粉红色）。为了视觉上突出细胞和全部组织形态的变化，染色可以增加成像的对比度。组织学/组织病理学评估为纳米粒子对木同组织器官的急性或慢性毒性提供了形态学改变的物理证据。

（5）量子点标记技术检测生物体系的纳米粒子：量子点（QDs）与有机荧光团或荧光分子相比，具有许多优异的光学特性：荧光量子产率高、光稳定性好（抗光漂白）以及纳米粒子蓝光到红外荧光波长可调等，已被广泛用于生物医学领域。人们根据荧光量子点示踪动物或人体内纳米粒子，可得到它们的靶器官及组织分布，获得纳米粒子与生物有机体相互作用过程的重要信息。此外，QDs 本身是半导体纳米粒子，已成为体内良好的生物传感器，可以直接监测血流或心率。

（黄　敏）

第十一章　毒理学实验基础

毒理学是一门实验学科，毒理学实验是验证受试物对机体危害的重要手段，是探索有害物质毒作用机制的方法。本章从毒理学实验所应遵循的基本原则着手，介绍整体水平、器官水平、细胞水平及分子生物学水平毒理学实验的基本原理。

第一节　实验设计原则

实验设计是顺利进行科学实验的先决条件，是实验过程遵从的依据、实验数据处理的前提。良好的实验设计是保证实验结果质量的重要前提，其主要作用是减少误差，提高效率。此外，在实验设计时，还要考虑实验的科学性和逻辑性，以便使研究结果具有重现性，更可靠，更科学，经得起时间的考验。

一、实验设计的基本要素

受试对象，处理因素和实验效应是实验设计的 3 个基本要素。

（一）受试对象

受试对象即处理因素作用的对象，根据研究目的而定。在毒理学实验中，根据实验对象的层次主要分为整体动物实验、组织器官实验、细胞实验和分子生物学实验。对受试对象的总的要求是同质性和代表性。一是对处理因素要敏感，二是对处理因素的反应要稳定。

（二）处理因素

根据实验目的要观察的、能引起受试对象产生效应的因素称为处理因素。在进行毒理学实验时，处理因素可以是单因素，也可以是两个或两个以上的因素，但多个处理因素对受试对象共同作用时，不易判断处理因素的剂量与其作用性质和效应的关系，往往造成整个实验难以控制。因此，一般在一个实验中只设计一个处理因素，但对该处理因素应设多个处理水平，如对某一化学物的毒性进行观察时，要设计多个剂量组。

与处理因素共存，并能使受试对象产生效应的非处理因素称为混杂因素（confounder），混杂因素是干扰实验结果的重要因素，因此要尽量将其排除。

（三）实验效应

实验效应是处理因素作用于受试对象后的反应和结局。以实验中受试对象的某项（或某些项目）指标的变化来表示。这些指标应该具有客观性，精确性，特异性和灵敏性。

1. 客观性　该指标能用确定的标准来进行判断，而不受主观因素的影响。如观察某种酶活性的变化，它有具体的测定值，是一个客观的指标。如果观察动物活动能力的变化，则是一个主观的指标，难以准确进行描述和定量。

2. 精确性　精确性包括准确度和精密度。准确度指的是指标的测定值与真值的接近程度。精密度指多次测定结果的相符合程度。好的指标应该是既准确又精密。

3. 特异性　在毒理学上，特异性主要指对所测试的处理因素的特异反应，能够反映处理因素的某种特定的效应。但是，这种特异性是相对的，没有绝对的特异性。如四氯化碳引起肝脏损害，肝脏的病理学变化和功能变化对四氯化碳来说就是一个相对特异的指标。

4. 灵敏性　灵敏性是指某个指标对受试因素的反应性较高，在较低剂量下即可有该指标的明显变化。高灵敏性有利于对受试因素的有害效应进行评价和监测。

二、实验设计的基本原则

实验设计必须遵守对照（control）、随机化（randomization）和重复（replication）的 3 个原则。

（一）对照原则

在确定接受处理因素的实验组（experimental group）时，应同时设立对照组（control group）。对照是比较的基础，设立对照是控制混杂因素和偏倚不可缺少的重要手段。只有设立了对照才能将处理因素的效应充分显露出来，不设立对照往往会导致错误的结论，误将非处理因素造成的偏倚当成处理效应。

设立对照应满足均衡性（balance），指在设立对照时除处理因素不同外，对照组和实验组的其他因素尽量一致，以使对照组和实验组在其他方面接近或相似。在整个实验过程中，对照组和实验组应始终处于同时同地，即应设同期对照。有时可使用历史对照（historical control），文献记载或以往研究的结果，但要尽量少用历史对照。历史对照仅适用于那些受混杂因素影响较小的研究。对照组设立后，应对各组的基线（baseline）情况进行比较，检验各组开始时的状态是否均衡。

对照性原则是要求在实验中设立可与实验组比较以消除各种无关因素影响的对照组。实验组和对照组具有同等重要的意义，设置对照是减少或消除非实验因素干扰造成误差的有效措施。没有对照的实验结果是不能使人信服的。对照应有可比性，即在“同时同地同条件”下进行。必须将研究对象随机分配给对照组和实验组。对照设立有两种方式，即自身对照和组间对照。自身对照是指在同一个体身上观察实验处理前后某种指标的变化，即把实验处理前的观察指标，作为实验处理后同一指标变化的对照。也可以把两种实验处理在同一个体身上进行一前一后的比较。自身对照可有效减少个体差异对实验处理反应的影响。凡可进行自身对照设计的实验应尽量加以采用。组间对照是指将若干受试对象随机分成若干平行组，随机挑选一组作为对照组，其他组作为实验组，进行实验比较。

1. 空白对照（blank control）　对照组不接受任何处理因素。这在动物实验和实验室方法研究中最常见，常用来评定测量方法的准确度，观察实验是否处于正常状态等。例如，在实验

中设置空白对照或试剂对照，以检测本底值。在临床试验中，因涉及伦理道德问题，不宜用空白对照。空白对照简单易行，但由于它非盲，在以人为对象的研究中容易引起对照组和实验组在心理上的差异，可能影响结果的可靠性。

2. 阳性对照(positive control)　给予标准的阳性物质处理或经典的治疗(处理)方法作为阳性对照。例如，在检测某物质的雌激素效应时选择雌二醇作为阳性对照。在测定某毒物对神经系统的成瘾性时，常以吗啡作为阳性对照。在一次实验中，可根据需要选择一种或多种物质或方法作为阳性对照。阳性对照是判断实验是否成功的重要依据，应该出现阳性反应的阳性对照组如没有出现预期的结果，说明实验是不可靠的。

(二) 随机化原则

随机化是采用随机的方式，使每个受试对象都有同等的机会被抽取或分到不同的实验组或对照组。随机化是应对大量不可控制非处理因素的另一个重要手段，它使不可控制的混杂因素在实验组和对照组中的影响相当，并可归于实验误差之中；它也是对资料进行统计推断的前提。

随机化应贯穿于研究设计和实施的全过程，具体体现在如下 3 个方面：①抽样的随机：每个符合条件的受试对象被抽取的机会相等，即每个个体都有相同机会被抽到样本中来。它保证所得样本均有代表性，使实验结论具有普遍意义。②分组的随机：每个受试对象被分配到各组的机会相等。它保证受试对象的其他状况在对比组间尽可能均衡，以提高组间的可比性。③实验顺序的随机：每个受试对象先后接受处理的机会相等，它使实验顺序的影响也达均衡。

随机化的方法有多种，最简单是抽签或掷硬币。这种方法简单易行，但不适用于受试对象数目大的多组分配。在实际工作中常通过随机数(random number)来实现。获得随机数的常用方法有两种：随机数字表和计算机(或计算器)的伪随机数发生器。随机数字表常用于抽样研究及对病人、标本或实验动物等的分组。随机数字表内数字互相独立，无论横行、纵列或斜向等各种顺序均是随机的。使用时可从任一个数开始，可单行、单列，双行、双列，也可多行、多列，查取方向可向下或向上，亦可向左或向右；伪随机数一般是由计算器或计算机产生的介于 0 和 1 之间均匀分布的数字。常见的科学型计算器各种统计软件和编程语言均有伪随机数的发生器。

1. 完全随机化　就是直接对受试对象进行随机分组，但分组后各组受试对象的例数不一定相同。

2. 分层随机化　完全随机化虽然提高了各组的均衡性，但并不能保证各组间一定达到良好的均衡性。此时，应先对可能影响实验过程和结果的混杂因素进行分层，然后在每一层内进行完全随机化，即进行分层随机化。

(三) 重复原则

重复是指在相同实验条件下进行多次研究或多次观察，以提高实验的可靠性和科学性。重复包括以下 3 种情形。

1. 整个实验的重复　它确保了实验的重现性，从而提高了实验的可靠性。不可重复的研究是不可信的。通常体外实验都要重复几次，以避免机会的影响。

2. 用多个受试对象进行重复　它避免了把个别情况误认为普遍情况，把偶然性或巧合的现象当成必然的规律。通过一定数量的重复，使结论可信，即在每个组中要有足够的样本含量(sample size)。

3. 同一受试对象的重复观察　它保证了观察结果的精度。重复最主要的作用是估计实验误差。实验误差是客观存在的，只有在同一实验条件下对同一观测指标进行多次重复测定，才能计算出误差的大小；重复的另一作用就是降低实验误差，多次重复测定的均数误差较小。

一般估测的样本数：小动物（小鼠、大鼠、蛙、鱼）每组 10～30 例，计量资料每组不小于 10 例，计数资料每组不少于 30 例。中等动物（豚鼠、家兔）每组 8～20 例，计量资料每组不少于 8 例，计数资料每组不少于 20 例。大动物（犬、猫、猪、羊）每组 6～20 例，计量资料每组不少于 6 例，计数资料每组不少于 20 例。在一些特殊情况下，也有比上述样本数量还要少的实验，但实验的可靠性降低。

第二节　毒理学实验结果的统计分析

在评价毒理学实验的结果时，应综合考虑生物学意义和统计学意义。统计检验的假设是关于总体特征的假设，检验方法是以统计量的抽样分布为根据的，得到的结论是概率性的，不是绝对的肯定或否定，不等同于有或无生物学意义。对实验结果作出科学的判断和解释，应该根据统计学分析的结果、生物学知识和经验。

一、毒理学实验的统计学

毒理学实验统计学评价的主要进展是剂量-反应关系研究和对超离差数据的统计。严格执行毒理学实验设计的上述要求，才可能得到可靠性和重复性良好的结果，也是进行正确的统计学评价的基础。良好的质量保证和实验设计可以监控系统误差，而统计处理则用来确定随机误差。

毒理学实验的数据通常是由剂量水平和相应观察值组成的二维关系型数据。毒理学实验处理组与阴性对照组观察值均数的比较，如果资料可拟合某种分布，则适用于参数检验，其敏感度和效率高于非参数检验；如资料不能拟合某些已知的分布，则应进行数据转换，以满足正态性和方差齐性。如果任何变换都不能改善数据的分布，可能存在个别可疑值，应予以识别和剔除。另一方面，可使用不依赖总体分布模型的非参数统计分析。

一种毒理学实验资料可以有若干种正确的统计学分析方法，但可能不存在唯一正确的方法。其原因主要是表面上不同的统计学分析方法常以相同的统计学概念和模型为基础。另一方面，利用不同的统计学方法来评价毒理学实验资料缺乏比较研究。

（1）各处理组与阴性对照组的比较可根据数据的类型、方差齐性选择比较常用的统计学方法。如处理组与阴性对照组两两比较 t 检验、t' 检验、卡方检验，Fisher 确切概率法，u 检验，非参数法，如 Wilcoxon 秩和检验，多个处理组与阴性对照组比较 Dunnett 检验等。

（2）剂量-效应关系和剂量-反应关系是毒理学研究的重要内容。剂量-效应关系和剂量-反应关系的判定可以分为定性和定量统计学两大类。剂量-效应关系和剂量-反应关系的统计学定性分析即为趋势检验，而统计学定量分析则为模型拟合。

常规毒理学实验资料推荐的统计学方法，可以归纳为以下内容。

（1）体重和器官重量：体重常是毒性效应最敏感的指标之一。如果每组样本量足够大（10 或 10 个以上），可用下述方法：①器官重量计算为体重的百分比。②按体重或体重改变分析。如在实验开始，动物随机化分组（各组体重均数差别无显著性，各组所有的动物体重在总平均

体重的 2 个标准差之内),利用体重改变分析比较好。③对各组资料利用 Bartlett 方差齐性实验,检测方差齐性。根据方差齐性或不齐,决定进一步的统计学检验。如果样本量较小,可利用 Kruskal-Wallis 非参数检测。

(2) 临床化学:过去一般用 t 检验或 ANOVA,但并非是最适当的方法。因为这些生化参数很少是彼此独立的。通常,所研究的并不是单独某一个参数,而是与靶器官毒作用有关的一组参数,如 CPK, HBDH 和 LDH 同时增高强烈指示心肌损害。这时我们并不只是注意其中一个参数的增高,而是全部 3 个参数。而血清电解质(如钠、钾、钙离子)常相互影响,一种降低常伴另一种增加。而且资料的性质,由于这些参数的生物学性质或测定的方法,常不服从正态分布(为偏态分布)或为非连续的,如肌肝、钠、钾、氯、钙和血尿素氮。临床化学资料适用的统计学方法:①ANOVA, Bartlett 检验和/或 F 检验,t 检验,适用于:钙、葡萄糖、BUN、肌苷、胆碱酯酶、总蛋白质、白蛋白、HBDH、ALP、CPK、LDH、ALT、AST 及血红蛋白。②Kruskal-Wallis 非参数 ANOVA 适用于:总胆红素、GGT。

(3) 血液学:不同物种、品系的实验动物血液学检查的数据,所服从的分布也可能是不同的。这些参数的大部分是相互有关的,并依赖于所用的测定方法。RBC 数、血小板数和 MCV 可用仪器测定,数据适用于参数检验。血细胞比容(HCT)是由 RBC 和 MCV 得到的计算值,故依赖于此两个参数;但如直接测定,也可用参数检验。

血红蛋白是直接测定的并是独立的连续数据。但是,如同时存在血红蛋白的多种形态(氧血红蛋白、脱氧血红蛋白、高铁血红蛋白等),则可能不是典型的正态分布,而呈多模型分布。此时可用 Wilcoxon 检验或多重秩和检验。WBC 总数服从正态分布,并适用于参数检验。而 WBC 的分类或报告为百分比或乘以 WBC 总数得“绝对”分类 WBC 数。这些资料,特别是嗜酸性粒细胞不符合正态分布,应该用非参数统计。应注意,单个参数的变化很少有生物学意义,因为这些参数是相互有关的,应注意发现并分析预期的参数变化谱。

(4) 组织病理学损害发生率:在亚慢性和慢性毒性实验,强调了组织病理学检查。统计学分析是评价处理组动物组织病理学损害发生率是否高于对照组动物。除了癌发生率外,也应注重发现其他病理损害。在处理组和对照组动物病理损害发生率比较常用卡方检验或 Fisher 精确检验。利用双侧检验还是单侧检验取决于研究者的要求。对于多重比较可用 Bonferroni 法,而且可利用趋势检验来评价剂量-反应关系。

二、统计学意义和生物学意义

在评价毒理学实验结果时,要综合评价实验结果的统计学意义和生物学意义。

一般来说,具有统计学意义是具有生物学意义的必要条件之一。正确地利用统计学假设检验的结果有助于确定实验结果的生物学关联。在判断生物学意义(即生物学重要性)时,可考虑以下步骤。

1. 纵向比较　此参数的改变有无剂量-反应关系。化学物毒作用的剂量-反应关系是毒理学研究的基本假设。当某参数的改变存在阳性剂量-反应关系,就可认为此参数的改变与受试物染毒有关,具有生物学意义。

2. 横向比较　此参数的改变是否伴有其他相关参数的改变。例如,生化参数很少是彼此独立的,单个剂量组的一个参数有统计学显著性的改变一般不认为有生物学意义,除非此改变为其他参数改变所支持。如没有骨髓或脾组织学改变或没有高铁血红蛋白生成,则单有红细胞计数的改变是没有生物学意义的。同样,在免疫毒理学中,单有淋巴细胞计数的改变不伴有

淋巴结组织学改变也可能是没有生物学意义的。

3. *与历史性对照比较* 由于目前尚无公认的实验动物参考“正常”值，应由本实验室利用相同品系的实验动物和相同的溶剂，进行至少 10 次独立实验的阴性（溶剂）对照的资料构成，以其“均值±1.96×标准误”作为参考值的范围。同时进行的阴性对照应在历史性对照的“均数±3 标准差”范围之内，否则应重新实验。另有认为，凡某种观察值与对照组比较，差别具有统计学显著性（$P<0.05$），并符合下列情况之一者，即可认为已偏离正常参考值范围，属于有害作用。①其数值不在正常参考值范围之内；②其数值在正常参考值范围之内，但在停止接触后，此种差异仍持续一段时间；③其数值在正常参考值范围之内，但如机体处于功能或生化应激状态下，此种差异更加明显。应该指出，后两种情况需要附加的实验设计。

另外，还有一些其他的考虑。如处理组同时与对照组两组均数之差值应超过检测误差的两倍以上；某些血液生化指标（如 AST、ALT 等）的测定值升高才有生物学意义。

第三节 整体动物实验

一、实验动物的选择

实验动物的选择是动物实验研究中首要考虑的问题之一。不同实验的研究目的要求不同，不同种类实验动物也有其各自的生物学特点和解剖生理特征。随意选择动物用于某项实验可能会得出不可靠的实验结论。在实验研究中，选择动物应遵循以下原则。

（一）相似性原则

相似性原则是指利用动物与人类某些功能、代谢、结构及疾病特点的相似性选择实验动物。动物的物种进化程度在选择实验动物时是优先考虑的问题。在可能的条件内，应尽量选择在结构、功能、代谢方面与人类相近的动物做实验。

由于实验动物和人类的生活环境不同，生物学特性存在相同和相异之处。研究者在选择动物用于实验之前，应充分了解各种实验动物的生物学特性。通过实验动物与人类之间的特性方面的比较，做出恰当的选择。

一般来说，动物所处的进化阶段愈高，其功能、结构、反应也愈接近人类，如猩猩、猕猴、狒狒等非人灵长类动物是最类似于人类的。但是，非人灵长类动物属稀有动物，来源很少，又需特殊饲养，选择有很大困难。另一方面，也并非只有非人灵长类动物与人具有相似性，许多哺乳类实验动物在某些功能、代谢、结构及疾病特点方面也与人类近似。可从以下方面将不同实验动物与人类进行比较，充分了解其相似性和不同点。

1. *组织结构方面* 哺乳动物之间有许多组织结构上的相似点，因而其生命功能基本过程也很相似。如猪的皮肤组织结构与人类的相似，其上皮再生、皮下脂肪层、烧伤后的内分泌及代谢等也与人类相似，选用小型猪做烧伤实验研究较为理想。

2. *系统功能方面* 许多动物各系统的功能与人类是相似的，如犬具有发达的血液循环和神经系统，在毒理方面的反应和人类也比较接近，适于做实验外科学、营养学、药理学、毒理学、行为学等方面的研究。两栖类的蛙和蟾蜍大脑很不发达，当然不能用于高级神经活动的研究，但在做简单的反射弧实验时则很合适，因为最简单的反射中枢位于脊髓，而两栖类的脊髓已发展到合乎实验要求的程度，且其结构简单明了，易于分析。

3. 生理特性方面　许多哺乳类动物与人类一样，其心率、呼吸频率、体温三者成正比关系。发热时心率和呼吸频率都增加。但是，两栖类、爬行类是变温动物，体温维持与外界温度有关，因而选择两栖类或爬行类做体温调节方面的实验是不适合的。鸟类的体温比哺乳类的高。恒温动物的体温昼夜有一定变动范围，变动情况与行为类型有关，一般夜间活动的动物凌晨2时至3时是一日的峰值。了解这些与人类的细微差别，对具体研究是十分有益的。由于动物的临床生理观察指标随动物种类、年龄以及周围环境变化而有所差异，因此正常参考值有较大的变动范围，实验时应按照实际情况作具体考虑。

4. 繁殖特性方面　哺乳类动物与人类一样，性成熟、妊娠期和寿命一般是成比例的。寿命越长，妊娠期越长，性成熟越晚。许多实验动物有一定的繁殖季节，但有的在人工饲养条件下发生改变。单胎动物比多胎动物产仔数少，多胎动物中近交系产仔数比封闭群少。这些都是在选择动物时要予以注意的。

5. 体液成分方面　动物血液性状与人类一样，包括形态和功能两个方面。一般来说，与功能有关的各种指标之间都有一定联系，如若红细胞数目高，那么血细胞比容和血红蛋白含量都会高。体内的排出物有粪便、汗和尿液。鸟类粪便和尿液汇合于泄殖腔一同排出体外，而哺乳类有各自排泄孔道。尿液的排泄量和浓度与水的摄入量有关。淡水中生活的动物尿液是低渗的，海水中生活的动物尿液是等渗的，陆地上生活的动物尿液是高渗的，特别是沙漠中生活的动物。水分供给少的动物尿液以尿酸为主要成分，水分供给充足的动物尿液以尿素为主要成分，而水中生活的动物尿液则以氨为主。尿液的酸碱度因动物食性不同而有差异。草食类动物尿液呈碱性、黏度高，而肉食类动物尿液呈酸性，且有特殊的臭味。

6. 解剖特性方面　不同种类动物间椎骨有很大差异。哺乳类动物椎骨以胸椎和尾椎较大。尽管哺乳动物和人类颈部外观有长短之差，但颈椎都是7个。灵长类中，猿猴类几乎都是在树上生活，椎骨很小。真猿类的椎骨差异很大。齿式与动物的食性有密切关系，草食类和肉食类差异最为显著。草食类的臼齿上面扁平而且稍有一点凹状，而肉食类与此相反，呈凸状，面积小。草食类中，反刍动物没有上颚切齿，而兔的切齿外突，十分独特。杂食类动物，如猪的齿式与人类的情况就十分一致。

脑的重量与神经系统的发达程度成正比，灵长类特别大。消化系统的器官重量各种动物之间以及与人类之间没有很大差异，而呼吸、循环系统的器官重量差异较大，运动量越大的动物越重。鸟类越是在上空飞翔的，呼吸器官越重。肠道各部分长度与食性有密切关系。

脏器形态方面消化道各部分不仅大小因动物种类不同而不同，其形状、构造也因动物种类不同而有显著差异。反刍动物呈复胃，由多个胃构成。单胃动物之间胃的形状类似。动物种类不同，肝的分叶方式也存在差异。啮齿类动物肝的构成最为复杂。马和大鼠肝的特征是缺少胆囊。肺的形态因呼吸方式不同也有所不同。哺乳类和鸟类之间差异显著。肺的分叶情况因动物种类不同而有很大差别。脑的形态方面，越是低等动物嗅球所占比例越大，越是高等动物嗅球功能越弱。鸟类和哺乳类的脑活动中，睡眠与觉醒是不断交替的，前者睡眠有深睡眠和动眼睡眠之分。一般来说，睡眠方式与行为类型有关，穴居生活的动物深睡眠期较长。脑的新皮质与旧皮质的关系也因动物种类不同而不同。心脏形态方面，脊椎动物的心脏构成随等级提高逐渐完全，鱼类仅1个心房和1个心室，两栖类、爬行类有2个心房和1个心室(不完全)，鸟类、哺乳类有2个心房和2个心室(完全心)。血液循环系统也由普通环境向闭锁系统进化。完全心中，心室壁的特殊心肌的分布因动物种类不同而不同，心电图可显示出不同的波形特征。在形态和功能上，与人的心脏最类似的动物是犬。单胎动物和多胎动物的子宫形态也存

在明显差异。多胎动物中不同动物种间有的也有差异。乳腺分布和乳房的位置不同动物间也存在差异,单胎动物在局部,而多胎动物在胸腹部,分布较广。

7. *疾病特点方面* 实验动物有许多自发或诱发性疾病,能局部或全部地反映与人类类似疾病过程与特点,可用于研究相关的人类疾病。如突变系 SHR 大鼠,其自发性高血压的变化与人类相似,并伴有高血压性心血管病变,如脑血栓、梗死、出血、肾硬化等症状。猫是寄生虫弓形虫的宿主,当然在弓形虫研究中是一个很好的材料。同时,在研究白化病、关节炎、骨质疏松症等方面也较为理想。

(二) 特殊性原则

特殊性原则是指利用不同种系实验动物,机体存在的特殊构造或某些特殊反应选择解剖、生理特点符合实验目的和要求的动物。恰当地使用具有某些解剖生理特点实验动物,能大大地减少实验准备方面的麻烦,降低操作难度。

犬的甲状旁腺位于甲状腺表面,位置固定,多在两个甲状腺相对应的两端,故选用其做甲状旁腺摘除实验很合适。相反,兔的甲状旁腺则分布分散,除甲状腺周围外,还分布到主动脉弓附近,显然不适于做甲状旁腺摘除实验,但宜做甲状腺摘除后研究甲状旁腺功能的实验。

家兔颈部的交感神经、迷走神经和主动脉减压神经分别存在,独立行走,而其他动物,如猪、犬、猫等的减压神经并不单独行走。如要观察减压神经对心脏作用时,需选用家兔。家兔胸腔中有纵隔膜,做开胸和心脏实验时,只要不弄破纵隔膜,动物就不需要人工呼吸,给实验操作带来许多方便。猴等动物的气管腺数量较多,直至三级支气管中部仍有腺体存在,选用它作慢性支气管炎或研究去痰平喘药就很适宜。而小鼠、大鼠及豚鼠只有在喉部有气管腺,而支气管以下则无,在上述实验中就不宜选用。

大鼠肝脏再生能力很强,切除多达 70%肝叶仍有再生能力,很适合肝外科实验研究。但是,许多实验动物都有胆囊,大鼠却无,因而也就不能用来做胆囊功能研究的实验。

此外,不同种系实验动物对同一因素的反应有其共同的一面,但有的也会出现特殊反应。如何充分利用这些特殊反应,选用对实验因素最敏感的动物,对实验研究也十分有价值。大鼠垂体-肾上腺系统功能发达,应激反应灵敏,且各种内分泌腺体如垂体、肾上腺、卵巢易于摘除,适于做应激反应和内分泌实验研究。同时,大鼠的踝关节对炎症十分敏感,适于多发性关节炎和化脓性淋巴结炎的研究。

兔对体温变化十分灵敏,易产生发热反应,且反应典型、恒定,适于发热、解热和检查致热原的研究。豚鼠易于致敏,适于作过敏性实验研究。同时,由于其体内不能合成维生素 C,必须从食物中摄取,故作维生素 C 缺乏症的研究很适合。豚鼠血清中补体含量多,效价高,常用于免疫学和生物制品的研究。大多数实验动物,猴、犬、大鼠、小鼠等是按一定性周期排卵,而兔和猫属典型的刺激性排卵动物,只有经过交配刺激,才能排卵。因此,兔和猫是避孕药研究的常用动物。

(三) 标准化原则

标准化原则是指动物实验中选择和使用与研究内容相匹配的标准化的实验动物。为了保证实验结果的准确性和重复性,使用标准化实验动物是极其重要的。只有选用经遗传学、微生物学、环境及营养控制的标准化实验动物,才能排除微生物及潜在疾病对实验结果的影响,排除因遗传、污染而造成的个体差异。

选择何种遗传群动物,应根据不同的课题内容而定。近交系动物由于遗传纯合度高、个体

差异小、特征稳定，对实验反应一致性好，实验结果精确可靠而得到越来越广泛应用。

选择何种微生物等级的实验动物，也应根据各级动物的特点，结合课题研究的水平、内容及目的而定。一般而言，普通动物用于研究所获得的实验结果的反应性差，故主要用于进行探索方法的预实验。清洁动物是目前国内科研工作主要要求的标准实验动物，用于大多数科研实验。无特定病原体(SPF)动物可排除疾病或病源的干扰，适用于所有科研实验，是国际公认的标准实验动物。

所选用的动物类别或级别要与实验条件、实验技术、方法及试剂等相匹配。

(四) 规格化原则

规格化原则是指选择与实验要求一致的动物规格。由于不同动物对外界刺激的反应存在着个体差异，选择时，除了注意动物的种类及品系外，还应考虑到动物的年龄、体重、性别、生理及健康状况等要求，这也是保证实验结果可靠性和可重复性的一个重要环节。

1. 年龄　动物的解剖生理特征和对实验的反应性随年龄的不同而有明显变化。一般而言，幼龄动物较成年动物敏感，而老龄动物的代谢、各系统功能较为低下，反应不灵敏。因此，一般动物实验应选用成年动物。但不同实验对年龄要求不尽相同，需根据课题的内容而定。一些慢性实验因周期较长，可选择幼龄动物。有些特殊实验如老年病学的研究，则考虑用老龄动物。

由于不同种类实验动物的生活周期差别很大，动物实验时还要注意绝对时间和相对时间的区别。对不同动物而言，经过相同的天文学时间长度在生物学上却有不同的意义。例如，用犬做实验经过一年观察期和用大鼠做实验经过一年的观察期，其生物学意义是完全不同的。同样，用犬做实验从 1 岁到 2 岁的一年观察期和从 12 岁到 13 岁一年观察期，其生物学意义也不同。不同种属实验动物的寿命与人类具有很大差异。所以，选择动物时，应注意到各种实验动物之间、实验动物与人类之间的年龄对应。例如：1 岁的犬对应人的年龄约为 15 岁；2 岁的犬对应人的年龄约为 24 岁；5 岁的犬对应人的年龄约为 36 岁；8 岁的犬对应人的年龄约为 48 岁；10 岁的犬对应人的年龄约为 56 岁；12 岁的犬对应人的年龄约为 64 岁；14 岁的犬对应人的年龄约为 72 岁；16 岁的犬对应人的年龄约为 80 岁。

2. 体重　实验动物年龄与体重一般呈正相关性，可按体重推算年龄。例如，KM 小鼠 6 周龄时雄性约为 32 g，雌性 28 g；Wistar 大鼠则雄性约为 180 g，雌性 160 g。除了与年龄密切相关外，不同品种(系)、营养及饲养管理均影响动物体重。选择时，既要考虑体重符合要求的动物，又要注意其发育是否正常。

3. 性别　动物不同性别对同一药物的敏感性差异很大，对外界刺激的反应也各不相同。即便同一品系动物，也是如此。例如，氯仿对小鼠肾脏造成的损害，只在雄性动物中表现，雌性小鼠则不出现损害。一般而言，实验若对动物性别无特殊要求，则宜选用雌雄各半。

4. 生理及健康状态　动物生理特殊状态下，如雌性动物性周期的不同阶段、妊娠及哺乳期，机体对实验的反应性有较大改变，易导致其体重和某些理化指标也发生变化，从而影响实验结果。因此，除计划生育药物或生殖系统疾病方面的研究外，一般要避免选用。此外，动物的健康与否，直接影响到动物对各种外界刺激的反应性及耐受性，故选择健康动物用于实验研究是十分重要的。

(五) 经济性原则

经济性原则是指尽量选用容易获得、价格便宜和饲养经济的动物。在不影响整个实验质

量的前提下，尽量做到方法简便和降低成本。选用易于获得、最经济和最易饲养管理的实验动物。

一般认为，动物的进化程度愈高，对药物毒性的敏感性愈好。因此，毒理学研究中，要求最好使用两种动物进行实验，而且它们的种属差异越大越好。一般应包括一种啮齿类动物和一种大动物，如选用大鼠和犬。犬在毒理方面的反应和人类方面接近。在选用啮齿类动物时，以使用近交系动物更为适宜。若使用封闭群动物，最好将同窝动物均匀地分配到实验组与对照组中去，以减少个体差异。

在实验动物年龄方面，毒理学研究要求选用未成年的较为合适。因为在动物迅速生长时期进行药物的毒性实验，可以发现药物对生长及各器官，包括性器官成熟的影响。慢性实验开始时选择的小鼠年龄最好在2～3周、体重为8～9 g，大鼠不超过3周、体重为50～60 g。

二、常用实验动物品系介绍

（一）小鼠

生物学属性属脊椎动物门、哺乳动物纲、啮齿目、鼠科、鼷鼠属、小家鼠种。

1. 生活习性

（1）生长发育：小鼠在哺乳动物中体型最小，新生仔鼠1.5 g左右，45天体重达18 g以上。小鼠体重的增长与品系来源、饲养营养水平、健康状况、环境条件等密切相关。

（2）活动规律：小鼠性情温顺，易于捕捉，胆小怕惊，对外来刺激敏感，喜居光线暗淡的环境。习惯于昼伏夜动，其进食、交配、分娩多发生在夜间。一昼夜活动高峰有两次，一次在傍晚后1～2小时内，另一次为黎明前。

（3）采食特性：小鼠门齿生长较快，需常啃咬坚硬食物，有随时采食习惯。

（4）繁殖特性：小鼠性成熟早，繁殖力强，寿命1～3年。新生仔鼠周身无毛，通体肉红，两眼不睁，两耳粘贴在皮肤上。一周开始爬行，12天睁眼，雌鼠35～50日龄性成熟，配种一般适宜在65～90日龄，妊娠期19～21天，每胎产仔8～12只。可根据阴道栓的有无来判断小鼠是否发生了交配。

（5）群居特性：小鼠为群居动物，群养时雌雄要分开，雄鼠群体间好斗，群体中处于优势者保留胡须，而处于劣势者则掉毛，胡须被拔光。这一现象应与因寄生虫性或真菌性皮炎所致的掉毛相区别。

（6）温湿度要求：小鼠对温、湿度很敏感，一般以温度18～22℃，相对湿度50%～60%为最佳。

2. 常用品系　小鼠的品系很多，可分为近交系、突变系和封闭群三大类。近交系（inbred strain），如A、BALB/c、C_3H、DBA等。突变系（mutant strain），如nude、scid等。封闭群（closed colony），又称远交群（outbred stock），如KM、ICR等。

（1）KM小鼠：昆明小鼠，一直是我国生产量、使用量最大的远交群小鼠，被广泛应用于药理学、毒理学等领域的研究，以及药品、生物制品的生产与鉴定。KM小鼠、瑞士小鼠和欧洲小家鼠属同一起源，而与中国的小家鼠相差较大。KM小鼠引入中国已有50多年，与欧洲（美洲）现有的瑞士种远交群小鼠间也存在着遗传差异。主要表现在基因多态性不同，基因表现型也存在差异，遗传距离较远。中国各地的KM小鼠群体也出现不同程度的遗传分化，形成不同的亚系，遗传差异明显。昆明小鼠于1993年被收录入International Index of Laboratory Animals，定名为KM鼠，获得国际公认。

(2) BALB/c 小鼠:BALB/c 小鼠基因型为 *Aabbcc*,属近交系小鼠,毛色为白色。其乳腺癌发病率低,但对致癌因子敏感。乳腺肿瘤发生率为 10%～20%。有一定数量的卵巢肿瘤、肾上腺肿瘤和肺部肿瘤、白血病的发生。血压与其他近交系小鼠相比为最高,有自发高血压症。老年小鼠心脏有某些病变,雌雄小鼠常有动脉硬化。BALB/c 小鼠生产性能好,繁殖期长,一般无互相侵袭习性,比较容易群养。

(3) Nude 小鼠:裸小鼠,该小鼠先天性无胸腺,其 T 淋巴细胞功能缺陷。新生裸小鼠以无鼻毛为特征,足尖经常收缩,呈螺旋样畸形。成年雌性发情期不规则,卵巢小,用绒毛膜促性腺激素不能诱发排卵,雄鼠精子尾部呈盘卷状,新生裸小鼠 3 周后生长明显迟缓。裸小鼠纯合子全身几乎无毛,偶见背部有稀疏的带状毛,皮薄有皱折。皮肤色素 BALB/c - nu 为浅红色,白眼;C3H - nu 为灰白色,黑眼;C57Blnu 为黑灰色至黑色,运动功能正常。裸小鼠胸腺仅有残迹或异常上皮,这种上皮不能使 T 细胞正常分化,缺乏成熟 T 细胞的辅助、抑制和杀伤功能。因而,细胞免疫力低下,失去正常 T 细胞功能,但其 B 淋巴细胞功能基本正常。成年裸小鼠(6～8 周龄)与普通鼠比较其 NK 细胞活性较高,而幼鼠(3～4 周龄)的 NK 细胞活性低下,裸小鼠粒细胞数比普通小鼠低。

裸小鼠是肿瘤学等方面研究难得的材料,是医学研究领域中不可缺少的模型动物之一。

(二) 大鼠

大鼠,生物分类学上属脊椎动物门、哺乳动物纲、啮齿目、鼠科、家鼠属、褐家鼠种。

1. 常用品系

(1) Sprague-Dawley 大鼠:简称 SD 大鼠,属远交群。其毛色呈白色,特征为头部狭长,尾长近于身长。Sprague-Dawley 大鼠产仔多,生长发育较 Wistar 大鼠为快,对疾病的抵抗力强。

(2) Wistar 大鼠:常用的 Wistar 大鼠既有近交系也有远交群。被毛白色,特征为头部较宽、耳朵较长、尾的长度小于身长。Wistar 大鼠性情温顺,性周期稳定,早熟多产,平均每窝产仔 10 只左右,生长发育快,乳腺癌发病率很低,对传染病抵抗力强。

2. 生活习性

(1) 生长发育:新生大鼠体重为 5～6 g,45 天体重可长到 180 g 以上,此时可供实验用。成年雄性大鼠体重达 300～800 g,雌性为 200～400 g。

(2) 活动规律:大鼠喜啃咬。白天常挤在一起休息,夜间活动。晚上活动量大,采食多。食性广泛,喜肉食。对光照、噪音敏感。

(3) 繁殖特性:大鼠 3 月龄完全性成熟,性周期 4～5 天,妊娠期为 19～21 天,哺乳期为 21 天,每胎产仔平均 8 只。可根据阴道涂片观察性周期中阴道上皮的变化,判断性周期各个时期中卵巢、子宫与垂体激素变化的状态。

(三) 犬

犬,系脊椎动物门、哺乳纲、食肉目、犬科、犬属、犬种。犬的品种多而杂,目前实验用的犬常为 Beagle 犬,原产于英国,特点是:体型小,短毛,性情温顺,亲近人,易适应环境、抗病力强,是国际公认理想的实验用犬。

1. 生活习性

(1) 活动习性:犬习惯于不停地运动,故饲养时应考虑有足够的运动场地,对生产繁殖的种犬更应注意。犬喜欢清洁,冬天喜晒太阳,夏天爱洗澡。

(2) 饲养习性:犬喜近人,易驯养,有服从人的意志的天性,并能领会人的简单意图。头颈

部喜欢人以手抚摸,但臀部、尾部忌摸。对环境适应能力强,成年雄犬爱打架。

(3) 采食习性:犬为肉食性动物,并习惯于啃咬骨头,也可喂杂食或素食。

(4) 繁殖习性:雌犬春秋两季发情,春季为3～5月,秋季9～11月,发情期8～14天,妊娠期55～65天,平均窝产仔数6～8只,哺乳期45～60天,寿命达10～20年。

(5) 感觉特性:犬的嗅觉和听觉特别灵敏。嗅觉灵敏度,超过人类1 200倍,听觉比人灵敏16倍。犬能靠熟悉气味识路。正常犬的鼻尖湿润,触之有凉感,它能灵敏地反映其健康状况。

三、受试物的处理

受试物的接受、分样、保管、称量、配制以及在此过程中严格的质量保证是急性毒性实验成功与否的重要环节。实验前受试物的化学结构、纯度、杂质成分、理化性质特别是挥发性、溶解性等均需了解,检索与受试物化学结构和理化性质相似化学物的毒性资料。计算实验所需受试物的总量,一次备齐全部实验的用量,以同一批号为宜。受试物成分和组成应稳定不变,异构体混合物,其异构体比例必须固定。

配制受试物常用溶液、混悬液、油溶液。经口染毒时水溶性受试物的溶剂,通常为蒸馏水或去离子水。注射等胃肠道外染毒需用生理盐水,保持与体内渗透压一致。不溶于水的受试物应溶于或悬浮于适当的溶剂中,常用的有0.5%羧甲基纤维素钠、10%阿拉伯乳胶、天然植物油(如玉米油、橄榄油)。受试物一般应临用前新鲜配制,除非已证明溶液贮存是稳定的。

受试物配制的浓度要根据受试物的毒性大小和实验动物的适宜染毒量适当配制,毒性较大的受试物给药量较小,一般按适宜染毒量染毒。毒性较低的受试物常需一次较大量的染毒,但不应超过最大给药容积,以减少非特异性因素对受试物急性毒性的影响。染毒量的大小要根据染毒途径和实验动物物种来确定。一般推荐的最大染毒量为:①经口20 ml/kg(对空腹动物);②经皮2 ml/kg(或根据体表面积计算,以保证染毒的准确性);③静脉1 ml/kg(5 min以上);④肌内注射0.5 ml/kg(一个部位);⑤每眼0.01 ml;⑥直肠0.5 ml/kg;⑦阴道:大鼠0.2 ml,兔1 ml;⑧吸入2 mg/L;⑨经鼻滴入:猴或犬每鼻孔0.1 ml。

四、实验动物染毒

染毒方式选择主要考虑保持与人实际接触该受试物的途径和方式一致。实际工作会根据有关机构的毒性评价程序的要求、受试物的性质和用途以及便于不同化学物之间毒性大小的比较等因素做出决定。急性毒性实验最常用的染毒途径为经口、经呼吸道、经皮及注射途径;慢性毒性实验常用的染毒途径为经口、经呼吸道。

1. 经口(胃肠道)染毒　经口途径可分为灌胃、喂饲、吞咽胶囊等方式。一般来说,新的化学物均先进行经口染毒途径的急性毒性实验求出LD_{50}值。通常以经口途径的LD_{50}值来比较不同化学物急性毒性大小。

经口灌胃染毒是急性毒性实验中最常用的染毒途径,因灌胃量大小可影响受试物的毒性,急性毒性实验最好是利用等容量灌胃法,即受试物按不同剂量组配制成不同浓度,实验动物单位体重的灌胃容量相同。灌胃法优点是剂量准确,缺点是工作量大,并有误入气管和伤及食管的可能。吞咽胶囊常用于犬、猴的给药。将一定剂量的受试物装入胶囊中,放至舌后部,迫使动物咽下。此法适用于有异味、易挥发、易水解的受试物。喂饲法是将受试物掺入动物饲料或饮水中供实验动物自行摄入。喂饲法符合人类接触许多化学物的实际情况,染毒方便,但缺点较多,给药量误差较大。如拌入化学物后适口性差,会影响动物摄食、进而影响其生长发育。

胶囊和喂饲法一般不用于急性毒性实验，在实际工作中以灌胃为最主要、最常用的方法。

2. *经呼吸道染毒* 研究生产条件下以气体、蒸汽、粉尘、烟、雾等形式存在的工业毒物，评价空气污染物，以吸入为给药途径的药物，常采用经呼吸道染毒的途径。呼吸道染毒方式分为吸入和气管内注入；吸入染毒又分为静式吸入染毒和动式吸入染毒。

3. *经皮染毒* 外源化学毒物经皮肤接触的机会很多，如农药、化妆品、工业毒物、环境污染物、外用药物等，职业接触也很多见。与人类皮肤解剖、生理特征较近似的动物为小型猪、家兔或豚鼠。但是，由于外源化学毒物经皮肤染毒途径的急性毒性实验所需动物数量较大，使用猪、兔和豚鼠不经济，因此常用大鼠。

4. *经注射途径染毒* 对注射药品或需作比较毒性观察的药品进行急性毒性实验时，须作经注射途径染毒。另外，在进行化学毒物毒作用机制研究，了解毒物代谢动力学等研究时，常采用注射途径。注射途径可分为静脉注射或滴注、腹腔注射、肌内注射、皮下注射、皮内注射、椎管内注射等。

第四节 离体器官实验

离体器官的灌流技术是在体外，通过一定的设备、装置和条件等，模拟动物和人体器官在体内必要的存活环境，研究器官对外源化合物的代谢、屏障以及外源化合物的毒性等规律的技术，该技术将受试物在体内经过的复杂过程简单化，利于研究受试物在特定器官的效应。

一、离体肺灌流技术

离体肺灌流技术是模拟肺在生理条件下的呼吸循环功能，利用全血或生理性灌流液对离体全肺进行灌流。利用这种方法可以研究灌流液的成分、各种内、外源性血管活性物质、药物、毒物在肺内的代谢情况以及对肺结构、功能（尤其是肺血管功能）的影响，因此被广泛地应用于生理、病理生理、药理、毒理学科学研究中。

1. *仪器装备* 主要包括恒温、呼吸、灌流、记录系统 4 个部分。恒温系统包括超级恒温器、回旋加热管、双层塑料盒；呼吸系统由小动物人工呼吸机与大鼠气管相连；灌流系统由恒温泵、导管、贮液池组成；记录系统包括压力传感器与计算机压力记录系统。

2. *灌流液体* 其目的是为组织提供正常代谢所需要的氧。可分为全血灌流与生理液体灌流两种。如果用全血灌流可将两只大鼠麻醉后，分别作颈总动脉插管，先对全身血液进行肝素化后，经颈总动脉抽取全血各 10～12 ml 作为灌流液体。生理性灌流液体的组成成分如下：NaCl 116.3 mmol/L，KCl 5.4 mmol/L，$MgSO_4$ 0.83 mmol/L，$NaHCO_3$ 19.0 mmol/L，NaH_2PO_4 1.04 mmol/L，$CaCl_2$ 1.8 mmol/L，D-glucose 5.5 mmol/L，为减少肺水肿的发生，加入 Ficoll 或低分子右旋糖酐4 g/100 ml，以提高灌流液体的胶体渗透压，调节 pH 值至 7.3～7.4 之间。

3. *通气气体* 为维持灌流液体中氧的含量，需对灌流液体进行通气。对生理性灌流液体的通气，O_2 的浓度要求要高些，可用 95%的 O_2 加 5%的 CO_2 混合气体。全血灌流液体 CO_2 的浓度仍然维持 5%，可将 95%的 O_2 的浓度降低，用 N_2 代替部分氧气进行灌流。

4. *注意事项* ①离体实验的关键在于对整个系统各项指标（温度、酸碱度等）的成功控制，使离体器官能够处在一个较为理想的环境；②实验操作要轻柔，避免造成对肺过大的人为

损伤；③恒流泵的流量要从小到大逐渐增加进行调节，切不可在实验开始时就将流量置于一个较大的位置上，避免肺水肿的发生。

二、离体心脏灌流技术

离体动物心脏灌流技术(isolated heart perfusion)是研究离体心脏在人工控制条件下(包括一定的灌流压力、温度、酸碱度及各种离子、营养物质等)，排除神经、体液因素的影响后，各种实验因素(包括生理试剂和药物)对心脏活动影响的一种可靠方法。心脏灌流模型按工作原理的不同可分为非做功和做功两种。非做功模型(Langendorff 灌流)是以恒压或恒流方式，从主动脉根部逆向用氧合盐溶液灌注心脏(逆行灌流)，逆行灌流过程中，主动脉瓣关闭，正如在体心脏处于舒张期一样，使得灌注液经冠状动脉分布，并流入冠状窦和开放的右心房。用于观察心脏的收缩力、冠脉流量及心脏节律等指标。但灌流过程中心室不充盈，不按照容量压力曲线做功，与生理状态偏离较大，所能观察的指标较少，不能满足心脏复杂功能研究的需要。为克服以上不足，Neely 等建立了离体工作心脏灌流(isolated working heart perfusion)模型，即在肺动脉或左心房内插入另一根导管，灌流液可经导管通过二尖瓣进入左心室(顺行灌流)，心脏收缩时左心室可克服后负荷将灌流液泵入主动脉而做功。通常是先行 Langendorff 灌流，待心脏恢复收缩后，再行顺行灌流，心脏开始做功，稳定后进行正式实验。工作心脏灌流模型的优点是心脏的活动接近活体条件下的情况，可同时研究心脏舒缩功能、心泵功能、冠脉灌注状态以及心肌氧耗、底物的利用、酶学改变等多项生理功能，应用更为广泛。许多动物如猫、犬、豚鼠、兔等的心脏均可用于心脏灌流。

Langendorff 心脏灌流的装置比较简单，主要由贮气囊、Mariotto 瓶、贮液瓶、双层灌流槽、恒温加热器及超级恒温水浴锅等组成充气、灌流和恒温 3 个部分。

为使离体心脏表面保持一定的温度和湿度，需将心脏置于由有机玻璃制成的双层灌流槽内。灌流时，灌流液从主动脉进入冠状血管后到右心房经腔静脉及肺动脉滴入槽中，经漏斗形开口流出，收集流出液以测定冠脉的灌流量。可在左心尖夹一蛙心夹，通过肌力换能器输入生理记录仪，记录心肌收缩力的变化。通过左心房插入尖端带有水囊或气囊的导管到左心室，用来测量左心室内压(LVP)等指标。超级恒温水浴锅供给恒温加热管和灌流槽夹层 37℃恒温水，以保持灌流液温度恒定。

离体工作心脏灌流模型装置的基本组成与 Langendorff 模型相似，只是更为复杂。

为使离体心脏处于成活状态并能正常工作，灌流液需供给其适当的氧、营养物质和其他底物。现一般用改良的 Kreb-Henseleit 缓冲溶液(其组成参见相关书籍)。

离体心脏不受整体条件下神经-体液的调节作用，且人工灌流液的组成及性状与正常活体状况相比，还有很多差异，不可视离体心脏完全等同于在体心脏。离体心脏维持时间不能过久，实验操作必须在一定时间内完成。对离体心脏灌流模型的改进有:保留部分交感神经，在灌流液中加入一定量的动物红细胞等。

三、离体肝脏灌流技术

离体肝脏灌流技术的原理是在麻醉状态下用外科手术使肝脏形成体外循环，用蠕动泵将含低分子量葡聚糖和气体饱和的平衡盐溶液替代血流进行恒速灌流，使肝脏能在一段时间内维持其正常的生理、生化功能，从而实现在人工控制剂量的条件下，直接研究某一化学物在肝脏中的代谢变化以及对肝脏的作用。因此，肝脏离体灌流术的主要目的在于使肝脏具有独立

的符合生理条件的循环体系，并在严密控制的条件下使受试物与肝脏接触（受试物在整体动物中预先染毒或在灌流液中加入），继而分析从肝脏流出的液体以及肝组织的病理学检查，确定受试物在肝脏中所出现的变化和对肝脏的作用。所用仪器主要包括超级恒温水浴锅、蠕动泵、灌流仪、冷凝管、气体混合器、流量计、钢瓶、磁力搅拌器和贮液池等，由此而构成离体肝脏灌流三大系统：恒温循环系统、灌流液循环系统和气体交换系统。应保证灌流液中充入 O_2 和 CO_2 的比例约为 95∶5(V/V)。

离体肝脏灌流技术研究外源化合物在肝脏中的代谢具有如下优点：①灌流的肝脏本身仍属活体实验的范畴，保持了器官与细胞结构和功能的完整性，有完整的脉管系统，有正常的摄取、转运、代谢、排泄和分泌功能，可在一定时间内动态观察受试物进入肝脏后所发生的变化，故在很大程度上克服了某些体外实验（如肝匀浆、游离肝细胞培养等）的不足。②离体肝脏灌流技术既能严格控制灌流液中底物和激素的浓度，又能排除肝外组织对其代谢和分布的影响，从而专一地研究肝脏对受试物的反应，从质与量上准确地给予评价。③灌流液的组成可精心调整，如下列参数：pH 值，电解质，携氧能力，蛋白质结合特性及营养物质和受试物的浓度等，而且营养物质和受试物是经正常的生理途径进入肝细胞的。④灌流液的流速可任意调节。⑤可多次连续经灌流液和胆汁采样，使摄取和排泄过程的动力学分析更精确，同时也可估算不同时间点肝内受试物的浓度。⑥离体灌流肝脏的功能状态可连续监测，每一处理前后可作自身对照。⑦易建立剂量-反应关系，即可在灌流液中加入不同剂量的受试物，造成一定的局部浓度而不受整体的干扰，可避免引起整体动物的中毒。⑧受试物的最终命运可以通过再循环系统测定，通过非循环系统可进行首过代谢或效应研究。⑨可以加入特别代谢物的抑制剂，以研究代谢途径。⑩肝脏供体动物可预先处理，以了解受损组织与正常组织的代谢差异。但是，灌流技术并不能完全替代整体动物实验和某些体外实验，应相互结合、相互补充和相互验证，才能获得较为科学的结论。

第五节 细胞实验

细胞是许多生物体的基本单位。随着毒理学的发展，环境因素对机体作用机制的研究已经从整体水平发展到细胞水平、分子水平或基因水平。使人们对各种有害的作用效应和机制有了更为深入的认识。

一、细胞培养的特点与应用

细胞体外培养，是指细胞在体外适宜的条件下生长和增殖的培养技术。体外培养的细胞源于体内，其生物学特征和体内相同，但经体外培养由于环境的改变会使体外培养的细胞某些生物学特征有所改变。

细胞是机体组织功能与结构的基本单位，其变化大体上可反映机体功能与结构的改变，而当机体功能与结构未发生改变时，细胞功能与结构也可能发生改变。因此，细胞培养技术是现代化生物学实验中常用的一种基本技术。通过一系列处理，从组织块中分离出单个细胞，然后在体外培养，或传代，可以观察到细胞功能与形态的改变。由于细胞培养技术比器官培养、组织培养更简便及人工合成培养基的应用，使这种培养技术规范化和标准化，实验结果稳定，可重复性强，可获得大量生物学性状均一的细胞进行研究，所得实验结果相对可靠、准确。目前，

细胞培养技术已成为广泛应用的实验手段。可分为原代细胞培养和传代细胞培养。

细胞培养在毒理学中主要应用于以下5个方面：①模拟外环境人为地控制条件，观察外环境各种物理、化学、生物等因素对细胞结构和功能产生的毒性作用。可观察单因素与多因素影响下的变化。②通过对靶细胞的直接细胞毒作用而避免了在整体动物的个体差异及体内各种复杂因素的干扰，体现其样本的均一性和特异毒性作用。③以细胞为对象，通过各种手段和技术直接观察或检测到毒物引起的致突、致畸、蛋白质合成、细胞间信息传递、染色体畸变、DNA损伤、细胞恶性转化等。从细胞水平或分子水平阐述有害物作用机制。④毒理学研究内容广泛，可以用人、动物的各种组织细胞观察毒物的作用强度及细胞代谢规律，用于药物的筛选及安全性评价。⑤不需要复杂的大型仪器设备，研究费用相对较低。

体外细胞培养在应用上具有很多优点，但细胞脱离体内生长条件在体外生长过程中，其细胞形态和功能会发生一定程度的改变，所获得的结果可能与人体或动物整体实验结果存在某些差异。因此，不可将体外细胞毒理实验结果直接推论到体内实验结果。对于体外培养的细胞应该把它们视作一种既保持有体内原细胞一定的性状、结构和功能，又具有某些改变的特定的细胞群体，而不能将之与体内的细胞完全等同看待。培养细胞存在一定的不稳定性是其不足之处。

二、细胞培养的类型

1. *原代细胞培养* 这是从供体取得组织细胞后，在体外进行的首次培养。此期细胞活跃，可见细胞分裂，但不旺盛。一般维持1～4周。因原代细胞刚刚离体，生物学特性未发生很大变化，在形态结构和功能上与体内原组织相似，细胞相互依赖性强，即细胞独立生存能力差，仍具有二倍体遗传性，是最接近和反映体内特征的原代细胞。原代细胞培养最常用的方法是：组织块法和消化法。

(1) 组织块培养法是较常用、简便易行和成功率较高的原代培养方法。将组织块剪切成小块后，接种于培养器皿表面。其器皿表面可根据不同细胞生长的需要做适当处理，如预先涂上一层胶原(鼠尾胶等)以利于上皮细胞生长。

(2) 消化培养法是将组织通过消化酶(如胰酶、蛋白酶、胶原酶等)作用进行消化分离，把妨碍细胞生长的细胞间质如基质、纤维等除掉，使细胞分散成单个细胞悬液，接种到培养皿中贴附生成。该法使细胞易于从外界吸收养分和排出代谢产物，可以很快得到大量活细胞，同时细胞也可在短时间内生长成片。本法适用于培养大量组织原代细胞。该法产量多，但步骤繁琐，易污染，一些消化酶价格昂贵，成本高。

2. *传代细胞培养* 原代细胞经培养不断增殖，原代培养细胞相互汇合后，需要进行分离培养，否则会影响细胞生长。细胞由原培养瓶内分离稀释后传到新的培养瓶的过程，称之为传代。初代培养的首次传代是很重要的。应注意：①细胞生长汇合未到一定程度(覆盖瓶底壁约80%)不要急于传代；②原代培养时细胞多为混杂生长，特别是上皮细胞和成纤维细胞并存的情况较为多见。此时可根据不同细胞对消化酶具有不同的耐受时间来进行分离和纯化；③经消化的细胞在分散吹打时动作要轻巧，尽可能减少对细胞的损伤；④首次传代时细胞接种数量要多一些，使细胞能尽快适应新环境而利于细胞的生存和增殖。

(1) 细胞系(株)的适应：原代培养细胞一经传代后便称之为细胞系(cell line)，在培养条件较好的情况下，细胞增殖旺盛并能维持二倍体模型。呈二倍体模型的细胞系称二倍体细胞系(diploid cell line)，为了维持二倍体细胞性质和原代细胞的生物学特征，应在传代后早期冻

存(常用细胞均在10代以内冻存),如不冻存(或无冻存条件)则需要反复传代,以维持细胞的适宜密度以利于生存。但对每一个细胞系来说都有其自身特点,因此要做好细胞系的维持,由单个细胞增殖形成的细胞群体或从细胞系中获得具有特殊性质或标志的培养物称为细胞株,细胞株的特殊性或标志必须在整个培养期间始终存在。如果不能继续传代或传代代数有限,可称为有限细胞株,如可连续传代(半年以上)则称为连续细胞株。

(2) 细胞系(株)的维持:细胞系的维持是通过换液、传代、再换液、再传代和细胞冻存来实现的,每一种细胞系均有自身的特征,为了保证该细胞系的稳定,在细胞维持中要注意以下4点。①建立细胞系档案:组织来源,生物学特征,培养液,传代换液时间,细胞遗传学标志,生长形态,常规病理染色等。这些记录对保证细胞正常生长保持细胞的一致及观察长期体外培养后细胞特性的改变都有十分重要的意义。②每种细胞系传代、换液都有着自身的规律性,因此不要因为传代时细胞密度过大而过于频繁或换液,给细胞的稳定性带来影响。③在进行各种细胞系传代时,应防止相互之间的交叉污染。所用器械严禁交叉使用。④每种细胞应有充足的备份,防止长期在外界传代造成污染而使细胞系绝种,特别是对二倍体细胞系不用时最好冻存。

(3) 培养细胞的纯化:体外培养细胞在原代培养时,由于机体内的细胞都是混杂生长,因此绝大多数都是各种细胞混合生长,而在利用体外培养细胞进行实验研究,都要求采用单一种类的细胞,这样才能对某一种细胞功能、形态等在外界各种因素作用条件下的变化进行研究。因而培养细胞纯化就成为体外培养细胞实验研究的重要环节。细胞纯化有两类方法。①自然纯化:自然纯化是根据某一种细胞的增殖优势,以自然的增殖活力排挤其他细胞生长,留下生长优势的细胞,从而除去其他细胞达到细胞纯化的目的。该种方法是非人为的选择细胞,需时间长。仅有成纤维细胞和恶性肿瘤细胞可以通过此方法来建立细胞系。②人工纯化:利用人工手段除掉某种细胞而达到纯化细胞的目的。

1) 酶消化法:由于上皮细胞比成纤维细胞对胰蛋白酶的耐受性强,因此在消化时,常常是成纤维细胞先脱壁,而上皮细胞要消化相当长的时间才脱壁,原代培养时此种差别尤为明显,因此经过多次差别消化可将上皮细胞和成纤维细胞分开。

2) 反复贴壁法:成纤维细胞与上皮细胞相比,其贴壁过程快,而上皮细胞则在短时间内(30分钟)不能贴附或贴附不稳定,稍加振动则即浮起,因此可将细胞分离纯化。

3) 克隆法:进行单个细胞的培养,生长后对每一克隆进行测试,选择出目的克隆细胞。

4) 限定培养基方法:某些细胞生长过程中需要特定的培养物质,如培养杂交瘤细胞常用HAT培养基来筛选杂交瘤细胞而抑制其他细胞生长。

5) 流式细胞仪纯化:根据细胞核酸含量,某些物质含量或细胞结构大小等参数,可采用流式细胞仪将细胞分离成不同的群体。

三、细胞的保存

细胞一旦离开活体,开始原代培养,其该细胞的各种生物学特征都将会发生变化,并随着传代次数增加而差异加大。因此,细胞的冻存是十分必要的。

(一) 细胞冻存

细胞冻存时,在不加任何保护剂的情况下直接冻存,则细胞内会形成冰晶,冰晶的形成引起细胞内一系列的不良反应。若细胞冰晶形成较多,随冷冻温度的降低,冰晶体积膨胀会造成DNA的空间构型发生不可逆的损伤,从而引起细胞死亡。因此,在细胞冻存时要尽可能均匀

地减少细胞内水分，减少冰晶的形成而达到减少细胞损伤的目的。

细胞冻存多采用甘油和二甲基亚砜作为保护剂。这两种物质对细胞无明显毒性，分子量小，溶解度大，易穿透细胞。提高细胞膜对水的通透性，降低冰点，再加之是缓慢冻存，可使细胞内的水分溶出细胞外，在胞外形成冰晶，这样可减少细胞内形成冰晶达到减少细胞损伤的目的。

（二）细胞的复苏

在细胞冻存时，细胞应缓慢降温而达到冷冻的目的。而细胞的复苏则需要将冷冻的细胞快速融化，这样可保证细胞外结晶在短时间内融化，避免由于缓慢融化使水分渗入细胞内形成再结晶对细胞造成损害。

（三）细胞的运输

为确保培养细胞在运输过程中不损伤，一般采用：①冷冻保存运输，即在特殊容器内存放液氮或干冰，将培养细胞存放于内，进行冻存运输。但该法不宜长时间运输。②充液运输，即将培养细胞（融合 30%左右）放在充满培养液的瓶内，瓶内保留微量空气，拧紧瓶盖并用胶带密封，妥善包装运输或放贴身的衣袋内。

（四）培养细胞的污染与处理

细胞能在体外环境生长良好，除需要好的条件和技术之外，最关键的是能否避免污染。

1. 微生物污染途径

（1）空气：空气是微生物传播的最主要途径，因空气流动性大，如果培养环境与外界隔离不严或消毒不充分，外界的不洁空气很容易侵入而造成污染。超净台不能正常工作，操作间与外界气流过强或工作时不带口罩等均可导致污染。空气是不断流动的，采用各种消毒措施也难以排出空气中所有微生物。一般培养室环境的含菌量应不超过 1～5 个/m^3，对空气的消毒可定期，必要时用 4%甲醛和高锰酸钾对培养室进行消毒。

（2）器材污染：各种培养器皿及器械消毒不彻底；CO_2 培养箱也易受细菌、霉菌污染，因为 CO_2 培养箱内温度适宜，湿度大，如果又采用开放式培养（如用螺口培养瓶或平皿）极易造成污染。因此，应定期用紫外线灯照射消毒，并用 1%苯扎溴铵清洁培养箱内壁。

（3）操作污染：工作人员无菌观念不强，动作不准确，不洁的手污染器皿等。培养两种以上细胞时因操作不规范，交叉使用吸管或营养液、培养瓶等，均可导致细胞交叉污染。

（4）血清污染：在生产血清时就已被支原体或病毒污染。

（5）组织样本污染：特别是原代培养，其组织来源已被污染或在取组织过程中使用碘酒消毒，可造成碘污染使这些混入组织中的碘可以影响细胞生长。

2. 微生物污染对细胞的影响

不同的微生物污染对细胞的影响是不同的。

（1）真菌污染：微生物污染以真菌污染最多见。虽然真菌种类繁多，形态各异，但污染后不难发现。污染后多数在培养液中形成白色或浅黄色漂浮物，一般肉眼可见，镜下观察发现纵横交错、在细胞间形成丝状、管状或树枝状菌丝。念珠菌和酵母菌呈卵圆形，散在细胞间和周边生长。

（2）细菌污染：常见的是革兰阴性菌，尤其以大肠菌污染常见。细菌污染后因可产生大量酸性物质能改变培养液的 pH 值，并使培养液变混浊，由于细菌繁殖迅速并产生毒素，可抑制细胞生长，毒性大的能很快导致细胞崩解。

(3) 支原体污染:支原体是细胞培养中最常见、不易被发现而又干扰实验结果的一种污染。据报道有超过50%的细胞培养被支原体污染。支原体污染后可能改变细胞生长的特征酶种类、细胞膜的形成,也可导致染色体的畸变及细胞癌变等。细胞受到支原体污染后,严重时可使细胞增殖缓慢,部分细胞变圆,从瓶壁脱落;但大多数细胞受污染后,无明显变化或有多方面的微细变化;对细胞本身来讲,各类细胞对支原体的感受性和反应亦有差别。一般初代培养和二倍体细胞对支原体耐受性强,染色体的多倍体和无限生长的细胞系较敏感。

3. 微生物污染的排除　细胞受到霉菌、细菌或支原体污染,一般都很难排除和杀灭,对支原体尤为困难。因此,应以预防为主。如污染的细胞不具有重要价值,应尽快弃之,以防止污染扩大。对有价值的细胞可采取以下措施。

(1) 抗生素:细胞培养中用抗生素是杀灭微生物的重要手段,其使用原则是:预防性使用比污染后使用更好,联合使用比单一使用更好,当然反复使用抗生素可使微生物产生抗药性,且对细胞本身也有一定影响。因此,主张尽量不用抗生素。但是,对有价值的细胞仍需用抗生素挽救,此时可用比常量大5~10倍的冲击法,加药后作用24~28 h,再换常规培养液,有时可以奏效。

(2) 加温处理:根据支原体对热敏感的特点,可将受支原体污染的细胞放置在41℃中作用5~10小时,最长不超过18小时以杀灭支原体。但是,高温对细胞生长也会有影响,因此在实验前先用少量细胞作预实验找出最合适的时间和温度,尽可能保证既杀灭支原体又使细胞不致受到太大损伤。

(3) 动物体内接种法:把受支原体污染的肿瘤细胞接种到同种动物的皮下或腹腔,让动物体内的免疫系统消灭支原体,待一定时间后从体内取出细胞再进行培养。

四、培养细胞的生物特征与检测

(一) 培养细胞的常规观察

体外细胞培养在初代培养或传代培养过程中,均要进行连续的动态性常规检查,包括观察细胞有无污染、生长状态、形态和数量变化以及培养液是否需要更新和调整等。

1. 细胞的一般形态　对活细胞的观察是细胞培养工作的基本内容,实验者需每天或最多1~2天对细胞形态用倒置(相差)显微镜进行观察,在一般显微镜下生长良好的细胞透明度大、折光性强、轮廓不清。生长不良时轮廓增强,胞质中常出现空泡、脂滴和其他颗粒状物质,细胞间空隙加大、细胞形态可能变得不规则,失去原有特点,若因缺乏营养,则细胞内代谢物堆积、pH值发生改变,可导致细胞中毒和结构发生变化,严重时可导致细胞死亡。只有良好状态下的细胞才适用于进行实验。

2. 细胞骨架　细胞骨架是一种细胞器,它主要由微丝、微管及中间纤维组成,这3种成分对细胞的支持、细胞生成运动、分裂及分化起着重要作用。如肿瘤细胞的许多生物学特征与细胞骨架的改变直接相关。因此,观察细胞在不同状态下其细胞骨架的改变已成为研究细胞生物学指标之一。在光镜下检测的方法多利用非离子去污剂抽提,以除去可溶性蛋白质、脂质,再用细胞骨架特异性抗体进行免疫组化染色,从而使胞质内仅存的细胞骨架得以显现。也可用抗管蛋白免疫染色法获得更为清晰的染色效果。

3. 细胞生长的观察　细胞增殖生长能力是判定细胞活力的重要指标。

(1) 生长曲线:通过细胞生长计数来绘制。生长曲线是确定培养细胞的生长与死亡动态改变最简单而且直观的方法之一。将培养细胞制成细胞悬液,准确计数细胞,接种于多孔板

(24 孔或 21 孔)或培养瓶(21 瓶),分 7 组,每组 3 孔(瓶)。培养一周(7 天)。期间对每组细胞逐一计数,最后根据 7 天中细胞数值绘制成图,即为细胞生长曲线,细胞数量增加 1 倍的时间为倍增时间,可从细胞生长曲线中测知。

(2) 细胞分裂指数:这是指被测细胞群每 1 000 个细胞中分裂细胞占全部细胞中的比例,用此来表示细胞的增殖旺盛程度。在培养的活细胞中,借助相差显微镜观察,在细胞单层中可见到圆形透亮的细胞,即正在分裂的细胞,由于细胞分裂是动态变化过程,故在分析细胞分裂指数时需将被测细胞用 95%乙醇或 HE 染色封片。计数 1 000 个细胞中圆形细胞(分裂细胞)在全部细胞中所占的比例。

(3) 细胞周期:每一个细胞增殖过程都要历经一个周期,在整个细胞周期中有丝分裂仅占很短时间,大部分时间是间期,其中包括(G1 期+S 期+G2 期)和分裂期(前期+中期+后期+末期)。细胞周期可用来研究和观察细胞的 DNA 合成代谢和有丝分裂的动力学。

4. 细胞活力的测定 检测培养细胞的活力有多种方法,最常用的如下。

(1) 染料排除法:当细胞损伤或死亡时,某些染料可穿透变性的细胞膜与解体的 DNA 结合使其着色,而活细胞则能阻止这类染料进入细胞内,据此可鉴别死细胞与活细胞。台盼蓝排斥实验:将培养细胞制成细胞悬液,调整细胞浓度为 10^6 个/ml,取该细胞悬液 0.1 ml 加入 1 滴 0.4%台盼蓝,混匀,3 分钟内用血球计数板分别计数活细胞数和死细胞数,在光镜下死细胞被染成淡蓝色,而活细胞拒染。

(2) 四唑盐(MTT)比色法:显色剂四唑盐是一种能接受氢原子的染料,其化学名:3-(4,5)-二甲基噻唑-(2,5)-二苯基四氮唑溴盐,商品名噻唑蓝,简称 MTT。活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在细胞中,而死细胞则无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的紫色结晶物,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值可间接反映活细胞数量,在一定细胞数范围内 MTT 结晶物形成的数量与细胞数成正比。该法特点是灵敏度高、重复性好、操作简便。

(3) 克隆形成率:这是检测培养细胞能否增殖的过硬指标之一,细胞制成悬液后,以低密度(2~5 个细胞/cm^2)接种,这样单个细胞能持续增殖 6 代以上,形成细胞小群(克隆)的细胞百分数称为克隆形成率,表示细胞群的活力。其细胞接种的存活率与细胞活力成正比。

(二) 细胞染色体分析

在细胞有丝分裂期,染色质逐渐变粗变短,而形成染色体,特别是有丝分裂中期,染色体长短、大小、着丝点等特征较为典型,容易观察,因此在细胞遗传学研究中多采用有丝分裂中的染色体。已发展出染色体分带、姐妹染色单体分化染色、染色体原位杂交等多种技术,近年来又建立了染色体荧光基因标记法,使基因作为实体在染色体上显现。

1. 染色体显示 核型分析,即分析各种细胞的染色体数目。

2. 染色体结构分析

(1) 染色体畸变检测:有丝分裂中期在细胞学上能够区分染色体损伤,即染色体型和染色单体型,当诱变因子作用于 G1 期细胞时染色体尚未复制,故可导致染色体畸变,而诱变因子作用于 S 期和 G2 期细胞时,此细胞的染色体已分成两条姐妹染色单体,因而可出现染色单体畸变。染色体畸变是评价环境化学物对人体健康的损害的一个常用指标。

结果判断注意以下 5 点:①实验中检测到的一切畸变均为来源于不能被修复或不能正常修复时的损伤。②一般染色体断裂和再接合时,细胞在第一次分裂后因不能再分裂而致死。当对称性染色单体型互换、易位、缺失、可发生部分具有遗传上是平行时可以存活的易位,这种

细胞遗传的危害可能很大，因此这类损伤可采取其他补充实验。③每个细胞发生多个染色体畸变比只有单个畸变染色体的损伤更加严重。④裂隙不应计为有意义的畸变(特别高的发生率除外)，由多个裂隙引起的易位、放射体环，多着丝点等，为遗传性损伤指标。⑤判断受试物是否为诱变力阳性时，应全面考虑畸变类型、频率和剂量关系。

(2) 微核检测：微核是当某种化学物作用于间期细胞染色体导致染色体损伤(这种损伤表现为染色体断裂)，其断片或整条染色体从纺锤体脱落，当细胞进入下一次分裂的间期时，它们浓缩成小的核，即微核，微核实验的优点是操作简便，观察容易，凡是具有分裂能力的细胞，不论是体内细胞(人外周血白细胞，骨髓细胞)还是体外细胞(各种培养分裂细胞)，均可进行微核实验，微核游离于细胞质中与主核完全分开，着色与主核一致或略浅，大小为主核的 1/3 或 1/5。

(3) 染色体显带技术：染色体显带是对染色体标本以特殊处理后使染色体出现着色深浅不同的带纹，显示了染色体本身微细结构，一般认为易着色的阳性带，为含 A－T 多的染色体节段，相反含 G－C 多的阴性带，染色时不易着色。

(4) 姐妹染色单体差别染色：在分裂的细胞中，每条染色体由两条染色单体组成，每条染色单体由双链 DNA 构成，当细胞在 DNA 合成时，BudR(5－溴脱氧尿嘧啶)作为核苷酸前体取代细胞胸腺嘧啶核苷。两个细胞周期后，两条姐妹染色单体的 DNA 双链有了差别，一条姐妹染色单体的 DNA 其双链全为 BudR 取代，另一条的 DNA 中仅有一条链中有 BudR 取代，经染色后即可区分。该现象称姐妹染色单体互换(sister chromarid exchange, SCE)。

SCE 的发生是细胞分裂时 DNA 同源重组的结果，SCE 既可是一种自然的变化，也可能是受环境中各种物理、化学因素等作用使其发生率明显升高，因此在评价环境物质对遗传物质的损伤时是一种常用的方法。

(5) 高分辨染色体技术：氨甲蝶呤可抑制二氢叶酸还原酶，干扰脱氢 1－磷酸尿嘧啶核苷至 1－磷酸胸腺嘧啶核苷的合成，从而阻止 DNA 复制，阻滞细胞于 G1/S 期。当加入少量胸腺嘧啶核苷时则可解除对细胞的阻滞，使细胞同时开始 DNA 复制，到分裂高峰时，再用低浓度秋水仙素短时处理，可出现细胞的染色体收缩极少的晚前期、前中期、早中期和正中期细胞。

高分辨染色体使染色体长、带型多，大大提高了染色体微细结构的识别能力，该技术对一些染色体缺陷如染色体结构重排、易位、缺失、重复等难以观察的精确位置得以检出，进一步确定染色体异常改变与表型之间的关系，如遗传性疾病、肿瘤等。

(6) 染色体原位杂交技术(FISH 技术)：用荧光标记的已知核酸探针，在组织、细胞及染色体上检测特异的 DNA 或 RNA 序列。用于标记探针的半抗原报告分子多采用生物素或地高辛，然后分别与它们有特异性高亲和力的抗生物素和抗地高辛抗体结合，再在配体上分别连接不同的荧光物质，如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明等，最后在荧光显微镜下观察杂交信号。

FISH 技术中的注意事项：①各种溶液及器材事先须经无菌处理，操作时不得徒手触摸载玻片、盖玻片。②严格控制实验条件。杂交时的反应温度和杂交后冲洗时的条件应遵循所用探针的自身特点。③细胞固定得当这是获得理想结果的一个重要前提。在固定时要首先考虑探针能否进入以及与目的核酸杂交是否方便。若固定不当，核膜上开孔太小，则探针难以进入核内。反之，核内 DNA 流失，有可能丢失片段。④选择理想的探针最常见的问题是标记探针 DNA 分子过大，不易通过核膜进入核内，所以 FISH 中使用的探针一般要小。如果使用双链探针结果不理想，则可考虑换用单链探针。

五、细胞凋亡

对整个机体来说，凋亡过程实际上是机体内受损细胞、不需要的细胞快速、无害、不改变组织功能的情况下被清除的过程。凋亡在所有多细胞动物，包括脊椎动物、线虫和昆虫中都表现出高度的保守性。在毒理学实验中阐明外源化学物与凋亡的关系有助于对外源化学物致肿瘤、衰老等分子毒理学机制的理解。下面简单介绍一些凋亡评价的方法。

(一) 细胞凋亡的形态学评价

1. *倒置显微镜观察法* 将含有细胞的24孔培养板直接置于倒置显微镜下观察。凋亡细胞的体积变小、变形，细胞膜完整但出现发泡现象，细胞凋亡晚期可见凋亡小体。凋亡小体为圆形小体围绕在细胞周围，其折光性与正常细胞一样。贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落。

2. *姬姆萨染色法* 在普通光学显微镜下观察细胞形态。可见凋亡细胞皱缩，胞膜完整，胞质稀少或缺失，染成淡红色，凋亡细胞的染色质浓缩并靠近核膜，出现核着边现象，细胞核固缩破裂为数个圆形颗粒；亦可观察到核膜裂解、染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态。

3. *苏木精染色法* 普通光学显微镜下观察，凋亡细胞染色质凝集、明显呈嗜碱性而染成深蓝色，并附着在核膜周边，有时细胞核固缩碎裂为数个圆形的颗粒状结构。

4. *石蜡切片苏木素-伊红(HE)染色法* 光学显微镜下观察凋亡细胞皱缩，胞膜完整，细胞核嗜碱性强呈蓝黑色，呈环状或新月状，附在核膜周边，或细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒，核膜消失。胞质呈淡红色。凋亡细胞在组织中单个散在分布，坏死组织则呈均质红染的无结构物质，核染色消失。核呈绿色或绿蓝色着染，胞质呈红紫色着染；坏死细胞只有固缩细胞核呈绿色着染。

5. *荧光显微镜观察法* 可经Hoechst33258染色后在荧光显微镜下观察，活细胞核呈弥散均匀荧光，凋亡细胞的细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光。

6. *透射电子显微镜观* 凋亡细胞体积变小，细胞质浓缩，细胞核变小，凋亡早期的细胞核内染色质高度盘绕，出现许多称为气穴现象的空泡结构；晚期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化；细胞凋亡晚期，细胞核裂解为碎块，产生凋亡小体。坏死细胞的染色质稀疏，呈细颗粒状，分布无规律，边界不清，细胞质肿胀，细胞器结构破坏，细胞膜不完整。

(二) 细胞凋亡时DNA的改变

1. *DNA ladder测定*

(1) 琼脂糖凝胶电泳：细胞凋亡时主要的生化特征是其染色质发生浓缩，染色质DNA在核小体单位之间的连接处断裂，形成50～300 kb的DNA大片段，或180～200 bp整数倍的寡核苷酸片段，在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱(DNA ladder)。细胞经处理后，采用常规方法分离提纯DNA，进行琼脂糖凝胶和溴化乙啶染色，在凋亡细胞群中可观察到典型的梯状带。

(2) 简易末端标记法：当细胞量很少时，直接用琼脂糖凝胶电泳不能观察到DNA的片段，简易末端标记法利用凋亡细胞在核酸内切酶的作用下产生具有黏性末端的DNA碎片，可被Klenow聚合酶补平的原理，采用^{32}P标记的核苷酸和脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)使对纯化的DNA作简单的末端标记和放射自显影，便可检测梯状条带中核苷酸碎片。观察凋亡细胞中DNA ladder的形成。

(3) LM-PCR ladder(连接介导的PCR检测)：当凋亡细胞比例较小以及检测样品量很少

(如活体组织切片)时,直接琼脂糖电泳可能观察不到核DNA的变化。此时可以连上特异性接头,专一性地扩增核小体的梯度片段,从而灵敏地检测凋亡时产生DNA ladder。此外,LM-PCR检测是半定量的,因此相同凋亡程度的不同样品可进行比较。

2. 大分子染色体DNA片段的测定　细胞凋亡的早期,染色体断裂成为50～300 kb的DNA大片段。所有超过一定分子量、小的双链DNA分子在琼脂糖凝胶中的迁移速度相同。此时,凝胶不再按分子量的大小来筛分DNA,DNA像通过弯管一样,以其一端指向电场一极而通过凝胶,因此细胞凋亡早期产生的50～300 kb长的DNA大片段不能用普通的琼脂糖凝胶电泳来分离。通常采用脉冲电泳技术进行分离。此法是在凝胶上外加正交的交变脉冲电场。每当电场方向改变后,大的DNA分子便滞留在爬行管中,直至新的电场轴向重新定向后,才能继续向前移动。DNA分子量越大,这种重排所需要的时间就越长。当DNA分子变换方向的时间小于电脉冲周期时,DNA就可以按其分子量大小分开。

3. 凋亡细胞DNA含量的流式细胞仪分析　细胞凋亡的生化特征是激活细胞内的核酸内切酶将DNA切断,产生180～200 bp整数倍的不同长度的DNA片段。凋亡细胞经通透性处理或乙醇固定后不能完全保留细胞内降解的DNA片段,这部分DNA片段在随后的洗涤和染色期间由胞内渗出丢失,导致凋亡细胞与G1期细胞相比DNA含量明显降低,因此DNA直方图上在G1期峰前出现"亚G1期峰"。

4. TUNEL检测法　由于细胞凋亡中断裂的DNA链会产生大量的3′-OH末端,把脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)和生物素或地高辛标记的dUTP放在一起温育,TdT将标记的dUTP连接到凋亡细胞DNA片段的3′末端,然后再用荧光染料标记的生物素或地高辛抗体作为二抗进行反应,这样可使产生DNA断裂的凋亡细胞标记有增强的荧光。正常细胞几乎没有DNA的断裂,很少能够被染色,而凋亡细胞则显色。

(三) Caspase-3活性的变化

Caspase (cystein-containing, aspartat-specific proteases)的本质是一些半胱氨酸蛋白酶,它们是ICE(interleukin-1beta-converting enzyme)相关蛋白酶家族的成员。Caspase-3正常以酶原的形式存在于胞质中,在凋亡的早期阶段它被激活,活化的Caspase-3由两个大亚基(17 kD)和两个小亚基(12 kD)组成,裂解相应的胞质胞核底物,最终导致细胞凋亡。但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞中,Caspase-3的活性明显下降。激活的Caspase-3与几种重要分子的蛋白质水解有关,其中包括多型ADP核糖多聚酶(PARP)。PARP是一种与DNA复制和维持基因组稳定性有关的酶,激活的Caspase-3能将116 kD的PARP切割为85 kD的残基片段。这一切割可将PARP N端的DNA结合结构域与C端的催化结构域分开,最终使PARP失去正常的功能。Caspase-3与凋亡的关系非常密切。根据Caspase-3底物和Caspase-3醛抑制剂共同孵育时所生成的产物所发出的荧光强度的大小来判断Caspase-3的活性强度,了解细胞凋亡的情况。

六、亚细胞组分分离

亚细胞水平的体外实验由细胞分离出不同的细胞器及其组分,如也直接用于毒理学实验。线粒体、细胞核、内质网、溶酶体、高尔基体、胞内体(endosome)、微体(microbody)、细胞骨架等细胞器是细胞内的功能单位,随着超速离心技术的发展,已能将不同的细胞器或组分进行分离。在体外实验中对于这些组成成分的研究,有助于化学物引起毒效应的亚细胞定位、生物转化及毒作用机制的研究,从亚细胞水平深入阐述外源性化合物对细胞功能影响。

通常针对细胞器的不同理化性质对其进行分离，方法有差速离心、密度梯度离心、自由流电泳(FFE)、高分辨率密度梯度电泳(DGE)、免疫学分离、免疫自由流电泳(IFFE)等。

细胞内不同结构的比重和大小都不相同，在同一离心场内的沉降速度也不相同，根据这一原理，常用不同转速的离心法，将细胞内各种组分分级分离出来。分离细胞器最常用的方法是将组织制成匀浆，在均匀的悬浮介质中用差速离心法进行分离，其过程包括组织细胞匀浆、分级分离和分析三步，这种方法已成为研究亚细胞成分的化学组成、理化特性及其功能的主要手段。匀浆(homogenization)低温条件下，将组织放在匀浆器中，加入等渗匀浆介质(即 0.25 mol/L 蔗糖、0.003 mol/L 氯化钙)进行破碎细胞使之成为各种细胞器及其包含物的匀浆。分级分离(fractionation)由低速到高速离心逐渐沉降。先用低速使较大的颗粒沉淀，再用较高的转速，将浮在上清液中的颗粒沉淀下来，从而使各种细胞结构，如细胞核、线粒体等得以分离。由于样品中各种大小和密度不同的颗粒在离心开始时均匀分布在整个离心管中，所以每级离心得到的第一次沉淀必然不是纯的最重的颗粒，须经反复悬浮和离心加以纯化。分级分离得到的组分，可用细胞化学和生化方法进行形态和功能鉴定。近年来在传统的亚细胞分离技术基础上结合质谱鉴定技术建立了亚细胞蛋白质组学，相信这一技术平台必将促进机制毒理学的发展。

第六节　分子生物学实验

随着人类基因组计划的飞速发展，一些高新实验技术如 mRNA 表达和蛋白质表达技术的应用促进了毒理基因组学的发展。DNA 及 mRNA 微阵列技术用于评价基因表达的变化，可对生物样本中上千个基因的转录水平同时进行定量测定，可探索毒性损伤过程中不同阶段的特征性基因表达信号，有助于对毒作用机制的深入理解和早期生物标志的发展。蛋白质组学中建立和发展起来的一些新方法如表面增强的激光解吸质谱和抗体阵列可用来表现蛋白质谱，研究 mRNA 表达水平和蛋白质水平之间的差异及相互作用可以更深入探察基因的功能，并寻找化学物接触和预测毒性的蛋白质生物标志。通过分析 DNA 序列中单个核苷酸的改变与人类对化学毒物引起的疾病易感性增加或减少来判断个体对化学物中毒易感的差异。SNP 可以通过许多途径影响人体和化学物的毒性反应。例如，SNP 可以抑制与化学物解毒有关的酶的形成。当在已知的基因内发现 SNP，我们可以进一步研究此 SNP 如何影响基因组的通路。从组织细胞中个别或少数内容物的检测到全面审视机体所有基因、蛋白质和代谢物水平的各种“组学”技术的发展，并与生物信息学及传统毒理学渗透整合，形成了全新的系统毒理学(systems toxicology)，在阐明毒物对机体损伤作用和致癌过程的分子机制方面取得了重要的突破，产生了一些新的研究热点；建立和发展了许多新的分子生物标志，成为沟通毒理学实验研究与人群流行病学调查的“共同语言”，使宏观与微观研究有机地结合起来，改变了化学物危险度评价的模式，大大促进了环境医学和其他生物科学的发展。进一步深入了解这些技术的基本原理及应用范围，则将使我们能更灵活地运用这些方法，科学地设计研究方案。虽然细胞水平、分子水平的研究取得了很大的进展，但仅从基因分子水平研究外源性化学物的毒性及其机制是不够的，因为机体还有宏观的一面，必须把微观研究与宏观研究紧密结合起来，也就是将整体实验与体外细胞、分子水平的研究结合起来才能得出正确结果。下面将对常用的分子生物学技术做一些简单的介绍。

一、核酸印迹杂交

(一) 核酸杂交的基本原理

核酸的变性和复性：在化学和物理因素的影响下，维系核酸二级结构的氢键和碱基堆积力受到破坏，DNA 双螺旋解旋成为单链的过程称为核酸的变性(denaturation)。加热变性是实验室最常用的方法，它是将 DNA 溶液加热到 80℃左右，双螺旋结构受到破坏，氢键断裂，两条链彼此分开形成无规则线团。由于核酸分子都存在共轭双键，因而在 260 nm 都有一个特定紫外吸收峰，吸收值因为变性程度而急剧升高，该现象称为高色效应或增色效应。在热变性过程中，通常将增色效应达一半时即双螺旋被解开一半时的温度称为变性温度或解链温度(melting-temperature, Tm)。每一种 DNA 都有一个解链温度，通常 Tm 值在 85～95℃之间。解链温度受下列因素影响。

(1) DNA 碱基的组成：DNA 的 Tm 值主要与组成 DNA 分子中的碱基对成分有关，由于 G－C 碱基对含有 3 个氢键，而 A－T 只含有 2 个氢键，因此 G－C 含量越多，Tm 值就越高，A－T含量越多，Tm 值就越低。在标准条件下，Tm 值与碱基对组成之间的经验公式是：$Tm = 69.3 + 0.41(G + C)\%$。

(2) 溶液的离子强度：DNA 双链骨架上磷酸基团带有较多的负电荷，它们之间的静电排斥作用是使双链不稳定的因素之一。同一种 DNA 分子在不同离子强度溶液中其 Tm 值不同。在低离子强度溶液中，Tm 值较低，解链的温度范围较宽；在高离子强度溶液中，Tm 值较高，解链温度范围较窄。这是由于溶液中离子与 DNA 分子中磷酸基团形成离子键，即正离子可以封闭磷酸基团的负电性使 DNA 比较稳定，需更多能量才能使其变性，故 Tm 值升高。

(3) pH 值：核酸溶液的 pH 值在 5～9 范围内，Tm 值变化不明显。当溶液 pH 值<4 时，碱基 A、G、C 上的氮原子质子化；当 pH 值大于 11 时，碱基 G 和 C 上的氮原子去质子化，这些均不利于氢键的形成。

(4) 变性剂：各种变性主要是干扰碱基堆积力和氢键的形成，从而降低 Tm 值。核酸在变性过程中，其物理和化学性质也发生一系列变化，除紫外吸收值变化之外，还有黏度下降、沉降系数增加、比旋度降低、生物活性丧失、细菌 DNA 失去转化能力等。

变性的 DNA 两条互补单链，在适当条件下重新结合成双链的过程称为 DNA 复性(renaturation)或退火。DNA 复性后，理化性质和部分生物活性恢复。复性过程并不是变性反应的简单逆过程，变性过程可以在一个很短时间内完成，而复性则需要相对较长时间才能完成。复性开始时，两条 DNA 单链随机碰撞形成局部双链，若在此时局部双链周围的碱基不能配对则会重新解离，继续随机碰撞，一旦找到了正确的互补区形成一定长度的碱基对即称成核。一个稳定的成核区有 10～20 个碱基对。在此基础上两条单链的其余部分碱基就像“拉链”那样完成整个复性过程。

DNA 的复性速度受多种因素的影响：①DNA 的大小：DNA 片段小的比大的容易复性，反之亦然，信息含量少的比多的容易复性。这是因为片段大、信息含量大的 DNA 单链分子在溶液中相互碰撞概率相对较少，因而寻找互补链的机会也少，往往不能准确地重新结合从而影响复性速度。②DNA 浓度：DNA 浓度越大两条互补链彼此相遇的可能性越大，复性的速度也就越快。DNA 复性的速度服从二级动力学，即重结合的速度与两条反应单链浓度成正比。变性的 DNA 在一定条件下重新缔合不仅可以在同源的两条互补链之间进行，也可在不同源的两条 DNA 单链之间或 DNA 和 RNA 之间进行。因为复性是以互补碱基序列为基础，只要两

条单链之间存在全部或部分碱基序列就可以相互结合形成双链。

DNA 变性和复性的过程即是核酸杂交的基本原理。核酸分子单链之间在一定条件下通过碱基互补序列，以非共价键形成稳定的双螺旋区，是核酸分子杂交的基础。杂交分子的形成并不要求两条单键的碱基序列完全互补，只要有一定同源序性（不同来源）的单链彼此间有一定程度的互补序列就可以形成杂交链。因而，杂交分子可在 DNA 和 DNA、DNA 和 RNA、RNA 和 RNA 以及人工合成的寡核苷酸单链与 RNA 或 DNA 单链之间进行。

探针（probe）广义上讲是指能与特定靶分子发生特异性相互作用，并能被特殊方法检测的分子即称为探针。人们应用核酸探针就可以用于待测核酸样品中特定基因序列的测定。为实现对探针分子的有效检测，将探针分子用一定的标记物（示踪物）进行标记。这种标记物可分为两大类，即放射性核素标记和非放射性核素标记。被标记的核酸分子探针是核酸分子杂交技术的基础，广泛应用于克隆筛选、基因点突变分析以及某些临床诊断等方面。

设计寡核苷酸探针的原则如下：①探针长度。一般要求在 10～50 bp 之间，过长的探针合成困难，杂交时间也长，过短则特异性受影响。②G+C 含量为 40%～60%，超出此范围会增加非特异性杂交。③探针分子内部无互补序列，即不应有>4 bp 的碱基反向互补碱基对，否则探针内部会形成“发夹”结构。④避免同一碱基重复出现，一般不能多于 4 个，如—GGGG—或—CCCC—。⑤选定某一寡核苷酸序列后，最好利用基因库软件进行分析，与已录的各种基因序列进行同源性比较，若与非靶基因序列有 70%以上的同源性时，应重新设计探针。一个理想的探针标记物应具有以下 4 个特性：①具有高度灵敏性；②标记物与探针结合后，绝对不影响杂交时碱基配对，也不影响探针分子的主要理化特性，尤其是对杂交特异性、稳定性和 Tm 值无太大影响；③检测方法除有高灵敏性、高特异性、假阳性率低外，尚需考虑对环境污染少，价格低廉；④若用酶促方法标记，应对酶的 Km 值影响不大，以保证标记反应的效率和标记产物的比活性，也不影响下一步酶促反应。

（二）常用的核酸分子杂交

核酸分子杂交按其反应环境大致可分为液相杂交和固相杂交两类。液相分子杂交是最早使用的杂交方法。其原理是将参加液相杂交的两条核酸链都游离在溶液中，在一定条件下（溶液离子强度、温度、时间等）进行杂交，然后再将未杂交的探针除去，即得到杂交后的核酸分子。该方法的优点在于两条链杂交效率高于固相杂交，操作也较简便。但因杂交后难于将过量未杂交的核苷酸链全部除尽，也无法防止靶 DNA 分子的自我复性，因而误差较大。现已逐渐被固相杂交法所替代，使用范围没有固相杂交广泛。固相分子杂交是将待测的靶核苷酸链预先固定在固体支持物上，而标记的探针则游离在溶液中，进行杂交反应后，使杂交分子留在支持物上，故称固体杂交。固体杂交的优点是通过漂洗能将未杂交的游离探针除去，留在膜上的杂交分子容易被检测，能防止靶 DNA 的自我复性，故被广泛应用。固体支持物种类较多，有硝酸纤维素膜、尼龙膜、化学激活膜、乳胶颗粒、磁珠和微孔板等，以前两种使用最为广泛。常用的固相杂交类型有 Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交和组织原位杂交等。

1. Southern 印迹杂交　将电泳变性后的 DNA 转移至固体支持物上，再与探针进行杂交。

2. Northern 印迹杂交　将 RNA 从琼脂糖凝胶中转移到固体支持物（硝酸纤维膜）上，然后进行杂交的方法，此方法可用于测定细胞的总 RNA 或 mRNA 分子量大小。基本原理与 Southern 印迹杂交相似。

3. 组织原位杂交　是在细胞保持基本形态的情况下将探针注入细胞内与 RNA 或 DNA

杂交,杂交反应在载物片上的细胞内进行。所用探针可以是单链或双链的 DNA 或 RNA 探针。一般用 50～300 bp 长度的探针较合适。该法可以用来确定细胞内被检测对象在细胞内的位置。

二、蛋白质印迹杂交

蛋白质印迹杂交(Western blotting)是将 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的非标记蛋白质转移到固相载体上,再用特异性的抗血清或单克隆抗体对蛋白质进行鉴定及定量的技术。检测蛋白质的敏感性为 1～5 ng。

Western blotting 的基本原理:当蛋白质被高分辨力的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,可被分离成许多不同的蛋白质区带,蛋白质的各个组分被固定于凝胶的网状结构之中,为了进一步检测它们的免疫活性,将电泳后的蛋白质带经电转移技术,转到固相的硝酸纤维素膜上,再和特异性的抗体结合,经直接或间接抗原-抗体反应法显示特异性的阳性条带。

三、PCR 技术

PCR 是在试管中进行 DNA 复制反应,基本原理与体内相似,也是以 DNA 为模板,需要引物,需 DNA 聚合酶,需要 dNTP 为前体。不同之处是耐热的 TaqDNA 聚合酶取代 DNA 聚合酶,用合成的 DNA 引物替代 RNA 引物,用加热(变性)、冷却(退火)、保温(延伸)等改变温度的办法使 DNA 得以复制,反复进行变性、退火、延伸循环,就可使 DNA 无限扩增。

PCR 的引物决定 PCR 扩增产物的特异性与长度。因此,引物设计决定 PCR 反应的成败。PCR 反应中有两种引物,即 5′端引物与 3′端引物。5′端引物是指模板序列相同的寡核苷酸,3′端引物是指与模板 3′端序列互补的寡核苷酸。对引物的基本要求如下:①引物的长度:引物过短会影响 PCR 的特异性,要求有 16～30 bp,才能保证特异性结合;引物过长使延伸温度超过 TaqDNA 聚合酶的最适温度(74℃),亦会影响产物的特异性。②G+C 的含量一般为 40%～60%。③4 种碱基应随机分布,不要有连续 3 个以上的相同嘌呤或嘧啶存在。尤其是引物 3′端,不应有连续 3 个 G 或 C,否则会使引物与核酸的 G 或 C 富集区错误互补,而影响 PCR 的特异性。④引物自身不应存在互补序列而引起自身折叠,起码引物自身连续互补碱基不能大于 3 bp。⑤两引物之间不应互补,尤其是它们的 3′端不应互补。一对引物之间不应多于 4 个连续碱基有互补性,以免产生引物二聚体。⑥引物与非特异靶区之间的同源性不要超过 70%或有连续 8 个互补碱基同源,否则导致非特异性扩增。⑦引物 3′端是引发延伸的点,因此不应错配。由于 ATCG 引起错配有一定规律,以引物 3′端 A 影响最大,因此,尽量避免在引物 3′端第一位碱基是 A。引物 3′端也不要是编码密码子的第三个碱基,以免因为密码子第 3 位简并性而影响扩增特异性。⑧引物 5′端可以修饰,包括加酶切位点,用生物素、荧光物质、地高辛等标记,引入突变位点,引入启动子序列,引入蛋白质结合 DNA 序列等。引物的设计一般以电脑软件进行指导。

PCR 反应中变性这一步很重要,若不能使模板 DNA 和 PCR 产物完全变性,PCR 反应就不能成功,DNA 分子中 G+C 含量愈多,要求的变性温度愈高。太高的变性温度和时间又会影响 TaqDNA 聚合酶的活性。通常的变性温度和时间分别为 95℃、30 秒,有时用 97℃、15 秒。虽然 DNA 链在变性温度时两链分离只需几秒,但反应管内部达到所需温度还需要一定的时间,因此要适当延长时间。为了保证模板 DNA 能彻底变性,最好为 7～10 分钟,然后在以后的循环中,将变性步骤设为 95℃ 1 分钟。扩增 100～300 bp 短片段时,还可以用快速的两

步 PCR 法，即变性（94～97℃）、退火及延长（55～75℃）。

复性温度决定 PCR 的特异性，合适的复性温度应低于引物 *Tm* 值的 5℃。退火温度过低，会引起非特异性扩增；增高退火温度，可提高扩增的特异性，因此要严格规定退火温度。退火反应时间一般为 1 分钟。

延伸温度一般为 72℃左右，此时 TaqDNA 聚合酶活性为每秒钟掺入核苷酸 35～100 个，2 kb 的片段用 1 分钟已足够，若 DNA 片段较长，扩增时间可适当延长。延伸时间过长又可引起非特异性扩增。

循环次数主要取决于最初靶分子的浓度，过多的循环次数会增加非特异性产物量及碱基错配数。PCR 反应后期，扩增产物的增加并不成为指数方式，称为平台效应。平台效应可能与下列因素有关：dNTP 与引物浓度降低，酶对模板的比例相对降低，多次循环后酶活力降低，产物浓度增高后变性不完全而影响引物延伸等。

四、RNA 干扰技术（RNAi）

（一）RNAi 作用机制

RNAi 作用机制可概括为两个阶段。

1. *启动阶段*　dsRNA 被 Dicer 酶（RNase Ⅲ家族中特异性识别 dsRNA 的酶）以一种 ATP 依赖的方式逐步切割成 siRNA；这种双链 siRNA 包括约 20 个 bp，且每条链的 3′末端都悬垂着 2 个未配对碱基。

2. *效应阶段*　siRNA 聚集到一种包含着核酸内切酶、外切酶和解旋酶的复合物上，形成诱导沉默复合体（RISC，RNA induced silencing complex），然后 siRNA 经历一个 ATP 依赖的解双链的过程激活 RISC。在 siRNA 反义链的指导下，RISC 与目的 mRNA 互补结合并特异性切割 mRNA，mRNA 断裂的部位大约在 siRNA 互补结合的中部，mRNA 进一步降解，导致不能进行翻译过程，从而引起目的基因沉默。

也有人将 RNAi 的作用机制界定为准备阶段、起始阶段和效应阶段。RNAi 作用时，外源性（如病毒）或内源性的 dsRNA 在细胞内与 Dicer 结合，随即被切割成带有单链 3′端及磷酸化的 5′端的 21～23 nt 的短链 dsRNA，是 RNAi 的起始诱导物，即 siRNA。siRNA 与 Dicer 形成 RISC。siRNA 作为引导序列，识别靶基因转录出的 mRNA 并引导 RISC 结合 mRNA。随后 siRNA 与 mRNA 在复合体中换位，Dicer 将 mRNA 切割成 21～23 nt 的片段，特异性抑制靶基因的表达。新产生的 dsRNA 片段可再次形成 RISC 复合体继续降解 mRNA，从而产生级联放大效应。此外，siRNA 还可以在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的作用下进行大量扩增并转运出细胞，使 RNAi 扩散到整个机体并可以传代。

（二）RNAi 作用特点

（1）21～23 nt dsRNA 为降解靶基因的中介分子。小片段 RNA 由长 dsRNA 切割而来，而不是 dsRNA 针对的靶基因 mRNA 的产物。而且 21～23 nt dsRNA 为降解靶基因的介质分子，决定切割位置。

（2）细胞 RNAi 装置具有饱和性。RNAi 反应中特异性 dsRNA 到达一定浓度后不可再增加。有研究还发现，随着非特异性 dsRNA 浓度增加，特异阻抑反应逐渐减弱。

（3）RNAi 作用广泛。在新小杆线虫中发现 dsRNA 介导 RNAi 不仅在导入部位产生阻抑效应，而且可以跨越细胞界限弥散到其他腔道和组织发挥阻抑作用。

(4) RNAi需要ATP参与。当ATP水平由250 μmol降至10 μmol以下，加入外源性ATP，针对靶基因的dsRNA没有阻抑基因的表达。因此在体外RNAi是需要ATP合成的，外源性ATP不可取代。在ATP合成缺失的裂解物中不能发生RNAi。

(5) RNAi过程不需蛋白质辅助。

(6) RNAi作用的靶基因有一定的选择性。保守基因更易产生RNAi效应，而且神经元细胞较其他类型细胞对RNAi不敏感。参与精子运动的基因也很少能够发生RNAi效应。

(三) RNAi技术的应用

1. *RNAi在基因表达调控方面的应用* 可针对病毒致病基因设计短片段的dsRNA，对植物进行预处理，引发植物对病毒RNA的干涉，降解病毒的mRNA，使植物对病毒具有一定的抗病性。对转基因引发的RNAi，则可以利用各种RNA干涉缺失、压制缺失和共抑制缺失突变体抑制RNAi，使外源基因得以充分表达，培养更多更好的转基因动植物。

2. *用于功能基因组分析* RNAi具有高度的序列专一性和有效的抗干扰活力，可以使特定基因沉默，获得功能丧失或降低突变，协助功能基因组学研究。将功能未知的基因编码区或启动子区，以反向重复的方式由同一启动子控制表达。转录出的RNA可形成dsRNA，产生RNA干涉，使目的基因沉默，进而研究目的基因的功能。

3. *用于基因治疗* 针对有害基因序列设计dsRNA，将dsRNA导入生物体内，或让dsRNA在生物体内转录，利用dsRNA引发其同源内源有害基因的mRNA序列的降解，从而可达到抑制该有害基因表达的目的，包括各种人类疾病，特别是肿瘤和遗传病的相关基因。

五、转基因动物

(一) 转基因动物的产生

转基因动物(transgenic animal)是指体内基因组中稳定地整合有外源基因的动物，其外源基因可遗传给后代。用此种方法可建立转基因动物模型，以研究外源基因在整体动物中的表达调控规律；可改变动物基因型，使其表现型更符合人类需要；也可用转基因动物产生人类所需的生物活性物质。现在转基因动物模型广泛应用于生物医学各个领域，其中应用最多的是转基因小鼠。

(二) 转基因动物模型的构建

建立转基因动物首先要构建欲研究的目的基因，通过原核显微注射法、反转录病毒感染法与胚胎干细胞植入法导入基因建立转基因动物。

(1) 原核显微注射法：①准备假孕动物。以输精管结扎的雄性动物与可育雌性动物交配，交配后雌性动物不会受精，但能产生一系列妊娠变化而成为假孕动物。②收集受精卵。用妊娠的马血清及绒毛膜促性腺激素(HCG)使雌性动物排卵并与可育雄性动物交配，次日从输卵管内收集受精卵以备显微注射，正常情况下小鼠每次排卵6～7个，用激素诱发每次可排卵30～50个。③用显微注射的方法将外源基因直接注入受精卵的雄性原核内。受精卵的直径一般是70 μm，用于注射的玻璃针的直径是0.75 μm，通常向每个受精卵注入的溶液中含100～200个DNA拷贝的外源基因。④将注入目的基因的受精卵植入假孕动物的输卵管内，使其生长发育。注射过的受精卵应稍加培养，确定其仍存活后方植入假孕母鼠的输卵管或子宫中。每只假孕母鼠一次可植入25～30个注射过的受精卵，孕19～20天后产仔。

(2) 反转录病毒感染法：重组反转录病毒内含有目的基因、病毒LTR(长末端重复序列)

和包装序列(ψ),但没有病毒蛋白的基因。ψ-2细胞是经辅助病毒感染后的NIH3T3细胞。辅助病毒内无ψ序列而有病毒蛋白基因。当重组反转录病毒进入xlt-2细胞后,不仅含目的基因,而且两组缺陷的序列相互补充,此时的重组反转录病毒具有完整序列,可以形成完整的病毒颗粒。用这样的病毒再去感染受体细胞就可以实现基因转移的目的。

(3) 胚胎干细胞植入法:胚胎干细胞是指胚胎囊胚期的内细胞团中未分化的胚细胞,这种细胞具有高度分化的潜能。将携带外源基因的具有高度分化潜能的胚胎干细胞注入受体囊胚,所发育成的个体一部分组织中可整合外源基因并可在特异组织中表达。

(三) 转基因动物模型在毒理学中的作用

1. 致突变检测模型　转基因啮齿类动物突变测试系统在致突变机制研究中有潜在应用价值。现在国内外已建立了十多种转基因突变检测模型。与经典的Ames实验比较,转基因动物突变测试体系有许多优点,它是在活体内测试,可动态观察突变率,且在小剂量范围内进行,结果可靠;可测定包括生殖细胞在内的器官或组织的突变率和突变类型。但是,由于用转基因动物进行突变测试研究的时间不长,积累的实验资料少,要成为常规的突变筛选方法尚需许多工作要做。需建立一套标准的操作规程,如确定给药至测试突变的时间、应计数的菌斑数、确定测试的器官和组织、每组的动物数等。还需建立可测试大片段DNA损伤的测试体系,并尽可能降低费用以利于推广。为了降低靶基因的自发突变率,亟待设计更好的靶基因,从而提高转基因动物突变测试体系的敏感性。

2. 致癌检测的模型　利用该类模型可了解基因的改变与肿瘤的关系,进而了解外来物质的致癌作用机制。利用转基因动物将是此种研究的一个有力工具,且业已应用于实际的环境化学物的致癌物评价。

3. 其他毒理学机制研究模型　*CYP3A7* 为人胎儿肝脏细胞色素P450的主要形式,是导致化学物质具有致畸性和致癌性的催化酶之一。中国仓鼠肺细胞导入 *CYP3A7* 的cDNA后,对霉菌毒素的敏感性升高。把 *CYP3A7* 转基因小鼠与剔除了 *p53* 基因小鼠交配,培养出带有 *CYP3A7* 基因/*p53* 缺陷的小鼠,其肝细胞具备不死性,且具有 *CYP3A7* 酶的催化活性,提示这些细胞不仅可用于化学物质的人胚胎毒性研究,同时还为研究生物转化酶在中毒过程中的作用提供了有效的工具。3-硝基丙酸(3-NP)是一种作用于线粒体、选择性地损害纹状体的毒素,利用上述转基因小鼠揭示了氧自由基在3-NP的神经毒病理变化中起着重要作用。用乙型肝炎病毒(HBV)转基因小鼠进行黄曲霉毒素B1(AFB1)诱癌实验,结果表明HBV有与AFB1协同致肝癌作用。

4. 转基因动物应用于毒理学研究的特点

(1) 可根据需要导入目的基因:毒理学研究的目的之一就是要揭示毒物危害的本质,可以筛选对毒物敏感的目的基因,在分子水平上研究毒物的危害。

(2) 敏感性高:因为导入的外源基因对遗传损伤敏感性高,导入动物体内后其敏感性仍高,可在低剂量下检测,特别适宜于观察慢性低水平接触时的DNA损伤。

(3) 结果真实可靠:因为转基因动物是一完整生命体系,繁殖多代后仍能带有目的基因,某些特性与人类接近,这就从根本上优于以前的体外检测系统,所得到的结果具有很高的真实性。

(4) 可回收导入的基因:可从动物基因组中回收导入的基因以进行突变的精细研究,如测序、测定突变谱等。

(5) 节省实验开支:传统致癌实验一般需一年以上,以带有某种致癌基因的转基因动物致

癌实验3个月左右就能完成，而且比较敏感，因此可节省人力物力。随着科研用途转基因动物的商品化，这一检测体系必将日益推广。

六、基因芯片技术

基因芯片技术是一种建立在杂交测序基本理论上的技术，它利用固定在芯片上的几万至几十万条探针与样品进行杂交，在一步实验中获取大量的信息。它的出现使基因序列测定、基因功能测定等工作的程序得到了简化，使许多原来根本不可能实现的检测成为可能。实现了实验的全部自动化，操作简便，可以节约大量的时间和实验成本。基因芯片技术充分利用了生物科学、信息学等学科的成果，以一种综合、全面、系统的观点来研究生命现象。基因芯片能一次检测大量的目标分子，自动化程度高、效率高、成本低，在研究基因表达、疾病诊断、发现新基因、DNA测序和药物筛选中有广阔的应用前景。

基因微阵列型芯片是基于杂交测序法原理(sequencing by hybridization, SBH)。探针DNA是指要被有序地点样固定在玻片或硅晶片上的DNA片段，这些片段可通过PCR反应扩增细菌质粒中插入的基因组片段或用通过引物从cDNA文库中PCR扩增得到。这些大小和序列不同的片段分别经过纯化后，机械手高速将它们高密度有序地点样固定在玻片或硅晶片上，从而制备成DNA微阵列，用于检测待测样品中是否有与之互补的序列。DNA探针阵列与待测DNA进行杂交反应，冲洗去非特异性的DNA，然后检测在哪些位点上有杂交信号，再通过一定的算法就可以得到待测的DNA序列。DNA探针阵列的构建有两种方法：一种是离片合成法(off chip synthesis)，另一种是在片合成法(on chip synthesis)。

一旦荧光标记的样本与芯片杂交，未结合的物质将被洗脱，结合在特定位点上的待测物可通过荧光探测被检出。共聚焦扫描系统和DDC摄影都已成功地应用于结果的检测。每个位点上的荧光通过共聚焦点系统的一系列反射、过滤和聚焦可去除无关光线并使所需荧光聚集在光电倍增管上或等量探测器上。共聚焦扫描的信息获取仅需1～5分钟，远快于传统的放射自显影所需的1～10天。荧光数据获取速度快亦是微排列技术中的显著特点。探测得到的荧光信息会被进行数字化，以量化的形式呈现。量化信息的获取源自于对芯片图像的网格化处理和每个单元点平均荧光值的计算。荧光值的高低，通过与实验对照比较可以代表每个细胞mRNA的相对量。基因表达量和基因分型等参数便可由此获得，而且基因间的调控关系亦可由此确定。

七、DNA加合物检测技术

DNA加合物是亲电性的化合物或其代谢产物与生物体内的DNA形成的共价结合产物，是DNA化学损伤的最重要和最普遍的形式。目前认为外源化合物与DNA发生共价结合，形成的结合物一旦逃避自身的修复，就可能导致某些特异位点的基因突变，因此DNA加合物的形成被认为是致肿瘤过程的一个重要阶段。它可以作为接触生物标志来反映毒物到达靶位的内接触剂量；又可以作为一种效应标志物，反映DNA受到有毒化学物损伤的效应剂量。近年来DNA加合物的研究已成为现代毒理学领域的热点，并且具有重要的应用价值，其检测技术的研究也引起了人们越来越大的兴趣，并取得了极大的进展。

(一) ^{32}P后标记法

^{32}P后标记法测定DNA加合物是目前最常用的一种方法，其基本原理为：①含有加合物

的 DNA 链在内外切酶的作用下降解为 3′单磷酸核苷。②通过消除正常的核苷酸来富集加合的核苷酸。③在特异的 T_4 多核苷酸激酶的作用下，将具有高度特异活性的^{32}P－ATP 的磷酸根基团转移到加合的核苷酸的 5′端，使其形成 3′－5′二磷酸核苷。④将标记的加合物通过薄层层析技术分离。⑤放射自显影及定量分析。以后经过逐步改进，在^{32}P标记前利用各种方法来浓缩富集被加合的核苷，从而使方法的灵敏度提高。归纳起来有标准法、强化法（限量 ATP 法）、丁醇富集法、核酸酶 P′/S：富集法、双核苷酸/5′-单磷酸法、高效液相色谱富集法。在这些方法中标准法和限量 ATP 法目前仅在加合物不能充分富集的情况下使用，双核苷酸/5′-单磷酸法只在用标准富集法收集不完全的情况下使用，高效液相色谱富集法还需要改进，回收率需要进一步提高，其中以丁醇富集法和核酶富集法使用广泛。

（二）免疫学方法

用免疫学方法检测 DNA 加合物始于 20 世纪 70 年代，其基本原理是基于抗原和抗体的反应，主要用多克隆抗体和单克隆抗体检测法。Poirier 等 1977 年首先报道了用竞争性放射免疫法（RIA）测定 DNA 加合物，即利用放射性核素标记的化学物修饰的核苷酸与未标记的核苷酸竞争结合特定的加合物抗体，通过测定标记的抗原抗体复合物的放射性进行定量。经过改善和发展已经建立的方法包括竞争放射免疫法（RIA）、固相竞争或非竞争酶联免疫吸附法（ELISA）、放射免疫吸附法（RIST）和超敏酶促放射免疫法（USERI－A）。ELISA 利用固相结合的抗原和一种与酶结合的二级抗体，此二级抗体由于其所携带的每一个酶分子能水解许多底物分子而使得该方法具有高的灵敏度。而单克隆抗体方法的发展使免疫测定法的灵敏度极大提高，使免疫学法同^{32}P后标记法一起成为检测人类 DNA 加合物的常用敏感方法。

此外，DNA 加合物的检测方法还有荧光测定法、色谱-质谱法、核磁共振法、碱洗脱法及序列测定法等，在此不作逐一详述。总之，DNA 加合物的检测对毒理学、职业病学和流行病学的发展日趋重要，分子生物学理论和技术的迅速发展已经并将继续给毒理学带来崭新的研究契机，这种革新给疾病的预防及控制带来了无穷的潜力。

第七节　毒理基因组学

基因组学技术的迅速发展以及人类基因组测序的完成，实现了从整体和器官水平向细胞和分子水平的飞跃，促进了毒理学各个研究领域的发展，对毒理学研究方法、技术的改进产生了重大影响。毒物基因组学信息库的建立，可以为毒理学的研究提供很大方便。

毒物基因组学的基本方法是通过观察生物在接触毒物后基因表达谱的变化，筛选毒性相关基因、揭示毒作用的基因表达谱、快速筛选毒物、在基因组水平对化学物进行分类、筛选和检测基因多态性、检测基因突变、进行安全性评价等，从而解决化学物的联合作用、高通量筛选对人体有毒性作用或者潜在毒作用的化学物、研究毒作用机制等毒理学研究上的关键问题。毒理基因组学的主要研究平台有以下 4 个方面。

（一）基因/转录组学

基因芯片（Gene Chip，DNA Chip），也叫 DNA 微阵列（DNA micorarray）是将几千个基因特异的探针或 cDNA 片段固定在一块芯片上，用于对不同生理条件下基因表达调控和基因多态性检测，是一种快速研究基因表达差异及遗传变异的高通量工具。其检测原理是指按照预

定位置固定在固相载体上很小面积内的千万个核酸分子所组成的微点阵阵列。在一定条件下，载体上的核酸分子可以与来自样品的序列互补的核酸片段杂交。如果把样品中的核酸片段进行标记，在专用的芯片阅读仪上就可以检测到杂交信号，通过计算机分析得出这些基因在不同组织中表达的差异。其主要优点是用微量样品可以一次性测定所有的 30 000 个人类基因；缺点是需要测定组织或器官，实验费用昂贵，还可能出现假阳性。转录水平的改变不能有效地预测蛋白质水平的改变，还需要对蛋白质表达加以分析。

(二) 蛋白质组学

蛋白质组(proteome)一词由澳大利亚学者 Wilkins 和 Willianms 于 1994 年首先提出，指基因组表达的全部蛋白质，或细胞、组织、机体在特定时间和空间所表达的所有蛋白质。与基因组不同，某一生物体的所有细胞都是相似的，而蛋白质组却在不同细胞中差异很大。而且，对于蛋白质，还没有类似 PCR 的扩增机制被开发出。因此，科学家们也在不断地开发方法，从极少量的样品中抽提、分离并检测蛋白质。蛋白质组学研究是以二维凝胶电泳蛋白质分离识别技术和质谱分析鉴定技术两大技术为核心，例如，兴趣蛋白质点可用 2DE - MALDI - TOF MS 法作肽段指纹谱鉴定，对于已知蛋白质还可以免疫印迹法识别。常用的蛋白质分离方法是二维电泳，它具有一次分离，用计算机分析处理，并且能与质谱等分析鉴定方法相匹配的优点；而蛋白质分析技术有质谱、蛋白序列分析、氨基酸组成分析等。蛋白组学技术目前存在的瓶颈还制约着相关研究的深入，但其在相关研究中的应用已经为有关认识疾病的发病机制、寻找更佳的诊疗手段提供了有价值的发现。将蛋白固定在一些固相物质上可制成蛋白质芯片，蛋白质芯片是一种高通量的蛋白质组学研究方法，能一次平行分析成千上万的蛋白质，但是距离大规模应用尚需时日。

(三) 代谢组学

代谢组学关注的是各种代谢路径底物和产物的小分子代谢物，反映细胞或组织在外界刺激或是遗传修饰下代谢应答的变化。代谢产物的检测、分析与鉴定是代谢组学研究的主要内容，最常用的分析技术是核磁共振技术(NMR)和质谱(MS)。基于 NMR 技术的研究方法，并不需要进行样品的提取、纯化，可以无损伤地监测组织代谢表达谱的变化和动态地评估代谢信息，并在此基础上定位相应的靶组织、作用过程以及生物学标志。NMR 技术是利用高磁场中原子核对射频辐射的吸收光谱鉴定化合物结构的分析技术，不同样品的代谢物图谱有其特征性；对这种特征性进行区分、鉴定，从而找出不同机体、组织代谢的共性与个性。

(四) 生物信息学

生物信息学(bioinformatics)是研究生物信息的采集、处理、存储、传播、分析和解释等各方面的一门学科，它通过综合利用生物学、计算机科学和信息技术而揭示大量而复杂的生物数据所赋有的生物学奥秘。系统毒理学研究是建立在海量的基础研究数据之上，最常用的统计分析方法有聚类分析和主成分分析(principal component analysis, PCA)两种。聚类分析主要分为样本聚类和指标聚类，较难环节在于特征抽取和模式表示。通过指标聚类分析，对多种差异表达基因、蛋白质和代谢物进行分类，可揭示不同基因、蛋白质和代谢物的内在生物学联系。通过样本聚类分析，可以依据各种变量，如特异表达基因、蛋白质和代谢物，对不同来源的样本进行归类。利用公共数据库如 Gene Ontology(GO，即基因本体论)、GenMAPP 进行基因生物功能注释及通路模型绘制，直观地描述外源化学物作用到器官之后，根据其毒性机制而表现出来的行为。通路分析法利用的资源是许多已经研究清楚的基因之间的相互作用，即

生物学通路。研究者可以把表达发生变化的基因列表导入通路分析软件中，进而得到变化的基因都存在于哪些已知通路中，并通过统计学方法计算哪些通路与基因表达的变化最为相关。

（常秀丽，范奇元）

第十二章　毒理学实验室质量管理

毒理学肩负着保护各类化学品生产者和使用者的安全与健康、保护生态环境的重大责任。各类化学品的安全性评价或危险性评估是毒理学社会需求和作用的最重要的体现之一。而化学品的毒性测试结果是进行化学品危害性鉴别、分类、标签、安全性评价或危险性评估的基础，也是对化学品进行管理的主要科学依据。另一方面，随着经济市场化和全球化的发展，化学品毒性鉴定(评价)的作用不仅仅是传统意义上或道德层面上的科研活动；而是被赋予了更多的法律责任，成为应承担民事责任的法律层次上的技术服务行为。产品毒性鉴定既是产品安全性的技术保障，也是国际贸易中的技术门槛或技术壁垒之一。如果实验条件不符合要求或各实验室的实验操作程序之间存在较大差异，就极有可能影响实验结果的准确性、同一性和可重复性。因此，毒理学实验室，特别是对于为社会、企业提供以“鉴定(评价)报告”等技术服务凭证的各类化学品毒性鉴定机构，都要求必须实施全面质量管理，达到国内或国际技术标准要求并通过有关认可，同时按照各类化学品安全性评价或毒性鉴定技术指南(guideline)进行毒性测试，其输出的鉴定(评价)报告才具有权威性，才能满足社会的需求。

第一节　毒理学实验室质量管理体系的产生背景和意义

一、毒理学实验室质量管理体系

所谓质量管理体系是在质量方面指挥和控制组织的管理体系。毒理学实验室质量管理从实施的管理体系或通过认可的制度体系角度，主要可分为两种情况：一种是按国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)提出的管理体系，通过合格评定制度进行实验室认可；另一种是由不同政府行政管理部门制定的良好实验室规范(good laboratory practice, GLP)管理体系，通过不同政府行政管理部门或其委托的专门机构对GLP实验室符合性进行评价、认可。鉴于目前国内外承担各类化学品安全性评价或毒性测试、鉴定的实验室大多数都采用GLP质量管理体系，因此本章主要介绍GLP体系，而对ISO合格评定的实验室认可体系仅作简要介绍。

(一) ISO/IEC 17025:2005 质量管理体系

ISO/IEC(国际电工协会)提出的《检测和校准实验室能力认可准则》(ISO/IEC 17025)是

针对实验室的质量管理体系要求，也是专业化的实验室管理体系。1978 年，ISO 发布了第一个用于进行实验室能力认可的国际标准 ISO 指南 25《实验室技术能力评审指南》。之后，ISO 和 IEC 于 1982 年和 1990 年共同批准和联合发布了第二版和第三版 ISO/IEC 指南 25。1999 年，ISO 和 IEC 在结合第三版 ISO/IEC 指南 25 和 ISO 9000 系列标准(1994 版)的基础上，联合发布了第一版 ISO/IEC 17025《检测和校准实验室能力的通用要求》。由于 1994 版的 ISO 9000 系列标准已经被 2000 版所替代，ISO/IEC 17025 在 2000 版 ISO 9000 系列标准的基础上进行了修订。ISO 和 IEC 于 2005 年联合发布了 ISO/IEC 17025:2005(第二版)。ISO/IEC 17025:2005 共 25 个标准要素，包含管理要求和技术要求两大部分：管理要求有组织、管理体系、文件控制、要求和标书及合同的评审、检测和校准的分包、服务和供应品的采购、服务客户、投诉、不符合检测和(或)校准工作的控制、改进、纠正措施、预防措施、记录的控制、内部审核、管理评审；技术要求有总则、人员、设施和环境条件、检测和校准方法及方法的确认、设备、测量溯源性、抽样、检测和校准物品的处置、检测和校准结果质量的保证、结果报告。

1. 实验室认可目标

(1) 实验室良好的服务行为：有明确的法律地位和民事行为能力；具有公正和诚实的行为规范；克服不良行为；能够做到独立检验和独立判断。

(2) 运作有效的质量管理体系：有一个围绕检验活动的组织机构；明确的质量分工和职责(界定责任，做好自己应当做的事)；发自内心、能够打动客户的质量方针、服务质量目标和质量承诺(这是实验室工作的灵魂)；用文件去指挥和控制员工的活动；一套有效的内外风险控制措施；能够发现存在的问题并及时纠正。

(3) 真实、准确、有效、可靠的技术检测能力：符合能力要求的资源和活动(人员、机器/仪器、材料、方法和环境)并对资源和活动进行控制与管理；评价是否满足客户的要求；实施有效的检测质量保证措施，维护认可的能力。

(4) 质量合格(没有使用风险)的报告/证书：足够的信息；准确、清晰、明确、客观的检测数据和结论；实验室责任免除的声明。

2. 实验室认可的原则和依据　大多数国家在实验室认可工作中所接受的基本原则：①实验室认可是在政府支持下建立的能进行独立判断的体系；②实验室认可是一种非盈利的活动，不受任何商业性动机支配；③各国政府应承诺，在国家一级只建立一个实验室认可体系，不搞多个体系竞争。目前，除美国政府外(美国存在国立与私立的实验室认可体系)，欧洲、亚洲、大洋洲的各国和地区实验室认可体系都是遵循上述 3 条原则运作。我国的实验室国家认可体系也是这样。实验室认可活动中所遵循的原则是自愿性、无歧视性、专家评审和国家认可。

我国实验室认可的依据是 CNAS-CL01:2006《检测和校准实验室能力认可准则》(内容等同采用 ISO/IEC 17025:2005)。

3. 实验室认可机构

(1) 国际实验室认可合作组织(International Laboratory Accreditation Cooperation, ILAC)其前身是 1978 年产生的国际实验室认可论坛，是一个非政府间国际组织。总部设在澳大利亚。其宗旨是通过提高对获认可实验室出具的检测和校准结果的接受程度，以便在促进国际贸易方面建立国际合作。1996 年 ILAC 成为一个正式的国际组织，其目标是在能够履行这项宗旨的认可机构间建立一个相互承认协议网络。ILAC 目前有 100 多名成员，分为正式成员、协作成员、区域合作组织和相关组织等。ILAC 目标：①研究实验室认可的程序和规范；

②推动实验室认可的发展，促进国际贸易；③帮助发展中国家建立实验室认可体系；④促进世界范围的实验室互认，避免不必要的重复评审。ILAC 通过建立相互同行评审制度，形成国际多边互认机制，并通过多边协议促进对认可的实验室结果的利用，从而减少技术壁垒。我国是国际实验室认可合作组织的正式成员，并已分别签署了 ILAC 实验室互认和检查机构认可互认协议。我国已有少数安全性评价机构通过了 ILAC 的认可。

(2) 亚太实验室认可合作组织(APLAC)，是 1992 年在加拿大成立的一个区域性合作组织，由环太平洋国家的实验室认可机构和主管部门组成。包括中国实验室国家认可委员会在内的 16 个国家或地区的实验室认可机构签署了谅解备忘录。目前 APLAC 的秘书处设在澳大利亚国家实验室认可协会(NATA)。我国已分别签署了 APLAC 实验室互认和检查机构认可互认协议。

(3) 我国的实验室认可机构，是中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment，CNAS)，CNAS 隶属国家质量监督检验检疫总局，由国家认证认可监督管理委员会(CNCA)批准设立并授权的国家认可机构，统一负责对认证机构、实验室和检查机构等相关机构的认可工作。

(二) GLP 质量管理体系

GLP 是有关机构运行以及非临床人体健康与环境安全性研究的计划、实施、监督、记录、存档和报告的运行条件的一套质量体系，是国际公认的另一个实验室质量管理体系。很多国家分别制定有自己的 GLP，但影响较大、使用范围较广的有世界卫生组织(WHO)、经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development，OECD)和美国食品药品管理局(Food and Drug Administration，FDA)发(颁)布的 GLP 体系。在国际层面上，目前得到世界广泛承认和实施的是 OECD 提出的 GLP 原则。该原则已成为事实上的国际标准。我国国家认监委制定的 GLP 国家标准，等同采用了 OECD 的 GLP 系列文件。此处，通过 ISO/IEC 17025 和 OECD GLP 两个文件主要内容的对比，了解两个管理体系的异同。

OECD GLP 适用于所有非临床健康和环境安全研究。ISO/IEC 17025 适用于所有从事检测或校准的组织，以及将检测或校准作为检查和产品认证工作一部分的实验室。

GLP 通过建立质量保证计划，由质量保证部门执行质量保证计划，并对试验的全过程进行审查和检查。ISO/IEC 17025 通过建立质量手册，指定质量主管，并由质量主管按照日程表的要求和管理层的需要策划和组织内部审核。ISO/IEC 17025 从仪器设备、参考标准和标准物质 3 个方面规定了测量溯源要求。所有对检测、校准和抽样结果的准确性或有效性有显著影响的设备，在投入使用前应进行校准。对于校准实验室，设备校准计划的制订和实施，应确保实验室所进行的校准和测量可溯源到国际单位制(SI)。对检测实验室，还应确保所用设备能够提供所需的测量不确定度。标准物质应溯源到 SI 测量单位或有证标准物质，并按照规定的程序和日程对其进行期间核查，以保持其校准状态的可信度。GLP 也要求对研究使用的仪器进行定期检查、清洁、保养和校准。由实验室供应商提供实验用品、仪器、试剂、标准物质的合格评定证书和校准证书，以及有关标准物质特性、成分、纯度、稳定性的数据。

GLP 通过编写和使用标准操作程序(standard operating procedures，SOP)来保证操作的重现性和保证结果数据的可信性。编写和建立一套合乎 GLP 要求且合乎本研究机构实际情况的 SOP 是 GLP 软件建设的主要内容。SOP 的生效与改动必须经过质量保证部门的签字确认和试验机构负责人的批准。ISO/IEC 17025 没有标准操作程序方面的规定，而是通过实施有效的过程控制来确保实验结果的准确性和可靠性。另外，采取必要的结果确证手段和方法

灵敏度考证，防止出现错误的检测结果。

从成员职责看，OECD GLP 详细规定了试验机构管理者、项目负责人、项目代表、研究人员和质量保证部门的职责，特别是对试验机构管理者，OECD GLP 规定了包括人员、硬件、操作规范方面的 17 项职责。ISO/IEC 17025 对成员职责只做了大致规定。

GLP 规定每项研究之前应准备好详尽的研究计划。研究计划应得到项目负责人的批准，还应得到质量保证人员的 GLP 符合性确认。研究计划的修改应由项目负责人批准并存档，对于发生的偏离研究计划的情况应充分记录并妥善保存。ISO/IEC 17025 不需制定研究计划，主要采用以国际、区域或国家标准发布的方法。

GLP 需要进行分析方法的开发，分析方法不需要实验室间验证。ISO/IEC 17025 对实验室间比对以及能力验证等提出了具体的要求。

GLP 对委托方或客户的任务和职责有详细的规定。委托方评估并选择试验机构后，对试验机构的研究过程进行监督，以确保试验机构能够按照 GLP 原则的要求来进行研究。ISO/IEC 17025 中没有对委托方或客户相关职责的规定，只是要求实验室应有政策和程序处理来自客户或其他方面的投诉。

GLP 对记录和材料的存储与保管、档案管理员、文件、试验条目及试验时间、所有非主要支持设备、计算机软件有详细的要求。ISO/IEC 17025 则没有特定的要求。

由上可见，ISO/IEC 17025 和 OECD GLP 作为两种实验室质量管理体系，主要区别在于实验室的适用对象不同，以及由此产生的许多细节上的差异，具体见表 12－1。

表 12－1　ISO/IEC 17025 和 OECD GLP 的对比

主题	ISO/IEC 17025	OECD GLP
适用对象	所有从事检测或校准的组织	所有非临床健康和环境安全研究
质量保证	建立质量手册，指定质量主管负责	由质量保证部门执行质量保证计划
标准物质	可追溯到 SI 测量单位或有证标准物质	确证的，完全可追溯的，有来自顾客或供方的标明有效期限、储存、稳定性和一致性及纯度的适当文件
标准操作程序	没有标准操作程序方面的规定	通过编写和使用标准操作程序来保证操作的重现性和保证结果数据的可信性
成员职责	对成员职责只作大致规定	详细规定了不同成员的职责
研究计划	不需制定研究计划，主要采用以国际、区域或国家标准发布的方法	制定好详尽的研究计划
分析方法	需要实验室间比对以及能力验证	不需要实验室间验证
委托方	没有对委托方或客户相关职责的规定	对委托方或客户的任务和职责有详细的规定
档案设备	由顾客要求	有确定的要求

二、毒理学实验室管理体系产生的背景

(一) GLP 产生的背景

20 世纪 60 年代，由于发生了震惊世界反应停药害事件，药品的安全性问题成了社会关注的焦点，世界各国开始重视临床前的实验研究。

1972年10月20日，新西兰政府颁布了"实验室注册法规"，最先提出良好实验室这一概念。1973年3月27日，丹麦政府颁布了"国家实验室法规"，与GLP法规相似。其目的是保证实验的安全性和质量控制。不过，这两个国家的GLP立法并没有引起世界上其他国家的重视。

直到1974年，美国FDA在审查一家较大的制药公司为支持两个新药申请而提交的安全性研究报告时，发现报告中的数据前后不一致，而且有实验作弊迹象。美国国会开始重视对医药品规范问题，美国参议院检查了FDA的新药评审情况。FDA历经两年多的调查发现该公司动物实验数据中存在多种严重问题：实验数据抄录和统计处理错误，人为地采用实验结果的有利部分，故意隐瞒具有诱发肿瘤作用的结论，不向FDA报告。1975年10月，对人工合成色素"红色2号"大鼠致癌实验的检查发现：实验中很多对照组和给药组的大鼠笼具混乱，用于实验的500只大鼠中，仅对存活的96只进行了详细的组织病理学检查，而大部分大鼠实验中途死亡。于是，美国FDA和美国环境保护局（Environmental Protection Agency，EPA）对全国的研究机构展开了调查。美国EPA调查发现美国最大的工业生物测试实验室（Industrial Bio-Test Laboratories，IBT）和生物测试公司（Biometric Testing Inc，BTI）801项研究中，594项无效（占75%）；FDA发现66项重要研究中24项无效（占36%）。根据以上调查事实，IBT公司4名负责人被指控犯有欺骗罪。经过调查发现，虽然也存在故意隐瞒对产品不利的实验结论的情况，但广泛存在于各个企业、研究机构、学校中的更严重的问题是安全性实验的设计、进行和报告过程中存在着缺陷，从而导致研究报告的可信性大打折扣。存在的主要问题：毒性实验设计不合理、不充分，实施不仔细、分析或报告不准确；实验人员未进行资格审查和培训，没有意识到准确观察、准确给予供试品、保存记录和记录副本的重要性；实验室的环境、管理不符合要求，实验过程中没有设置质量监控系统；管理部门没能严格审评数据和适当地监督工作人员；实验记录不完整和原始数据未保存，无法审评所有数据；实验报告未进行准确性和完整性检查；委托方没有充分监督全部或部分由合同实验室进行的研究。

这些问题的存在有其客观原因。在动物实验中，影响实验结果的可变因素是复杂多样的，很难明确地指定某一个动物实验的误差范围。因此，对于某个特定的动物实验，还不能确立最佳实验方法，也很难采用通常的以理论为指导来推动研究的做法，不少情况下是凭经验尽量地接近真实的结果。在这种情况下，从事动物实验的工作人员就容易在不知不觉中形成如下一些观念：动物实验的对象是活的动物，所以得到的数据很分散是不可避免的；生物体通常是处在一种动态平衡状态下，这样每个特定时间的观察就都是不充分的，所以有些误差也是可以理解的；影响动物实验的可变因素复杂而且数量很多，因此，即使是同一实验也很难完全重复，没有再现性是当然的。这些观念的存在导致了安全性实验的领导者和工作人员对实验疏忽大意，产生许多人为的误差，这些误差可能就实验的某个环节来说是微小的，但累积起来，却可能使实验结论极大地偏离真实的情况。

FDA决定针对这类问题采取措施，在研究了各种方案之后，决定实施GLP。因为从FDA过去的经验和调查表明，安全性实验中存在的这类缺陷可以通过对研究机构、工作人员及研究程序的合理应用和控制制定出统一的标准来弥补。于是，1976年FDA颁布了美国的GLP法规草案，在广泛听取建议和举行听证会等程序之后，颁布了正式法规，于1979年6月生效。该法规通过强化所管辖产品非临床安全性研究的质量管理，大大提高了非临床安全性研究的质量，并规定不符合GLP标准的实验室，FDA概不接受其提交的安全性研究报批资料，其数据也不得与其他实验室或公司交换，迫使非临床研究机构达到GLP法规的要求。

美国实施GLP法规带动了其他国家对药物非临床安全性研究的管理，英国、日本、法国等国家纷纷于20世纪80年代早期发布了本国的GLP法规。1979年OECD成立GLP专家组，1982年OECD颁布实施化学品GLP。1983年EPA颁布实施《农药GLP规范》，1984年日本农林水产省（MAFF）颁布GLP公告，1987年欧盟颁布GLP法规和准则。1988年至2004年，欧盟又对GLP法规进行了7次增补和修订，OECD进行了12次增补和修订，但两者GLP的原则一致。尽管各国间有些差异，但基本内容一致，从而使GLP逐渐成为国际上各国安全性研究均遵守的管理规范。国际组织间的国际合作也在很大程度上推动了GLP的发展。此外，从1991年始，由日、美、欧三方发起的人用药品注册技术要求国际协调会（International Conference on Harmonization，ICH），对GLP的适用范围和药品非临床安全性研究的技术要求进行了协调，为药品注册数据的相互承认奠定了基础。

（二）实验室认可制度产生的背景

实验室认可制度起源于1947年澳大利亚的检测实验室认可（NATA）和1966年英国校准实验室（BCS）的认可制度，同年OECD建立了化学实验室评审制度（GLP）。由于美国和欧洲不断出现的贸易摩擦和纠纷，1973年关贸总协定的《贸易技术壁垒协定》（TBT协定）中采用了此制度。1977年和1992年在美国的倡议下先后成立国际实验室认可论坛（ILAC）（1996年转为国际实验室合作组织）和亚太实验室合作组织（APLAC）。其目的是协调贸易中的检验不一致，打破欧共体国家建立的技术壁垒。进入20世纪80年代，随着全球经济一体化的发展和贸易中不断加剧的技术标准与检验纠纷，1985年国际标准化组织（ISO）理事会决定成立了合格评定委员会（CASCO），制定专门用于合格评定的国际标准和指南，将各国合格评定的工作标准化、程序化进而推动合格评定的国际化，促进各国质量认证活动结果的相互承认，从而推动全球经济持续健康的发展。20世纪90年代以后，合格评定已经成为世界各国企业产品和服务进入市场的资信评定制度。为正确有效地开展质量评价活动，消除双边和多边贸易中各国和地区不断出现的“技术壁垒”、“绿色壁垒”等非关税壁垒（见图12-1），WTO在原来制定的《贸易中的技术壁垒协定——TBT》基础上又补充制定了《实施卫生与植物卫生措施协定——SPS》将其作为衡量各国工农业产品、服务质量和评价食品安全等级，协调检验不一致，消除国际和地区贸易中技术壁垒和绿色壁垒的一项重要举措。

三、实施实验室管理体系的意义和作用

（一）保护人体健康和生态安全的需要

毒理实验工作事关人体健康和生态安全，事关研制化学品的命运，责任重大。上述GLP实施前美国毒理实验室产生的种种问题，如不建立和实施质量管理体系，在各个实验室都是难免的，都会不同程度地存在。而不通过建立和实施质量管理体系也难以得到有效解决。正如FDA所述，在调查之前，FDA总是相信研究机构呈送上来的报告准确地说明了研究活动并精确地报道了研究数据，但事实并非如此。只有建立在法规和制度上的信任才是可靠的。因此，世界很多国家均已立法要求实施实验室质量管理体系。

（二）化学品管理的需要

毒理学安全性评价和生态毒理学评价实验是评价化学品危害性的基础，是国际上许多发达国家化学品登记管理的重要评审依据。联合国全球化学品统一分类和标签制度（Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals，GHS）是根据1992年里约

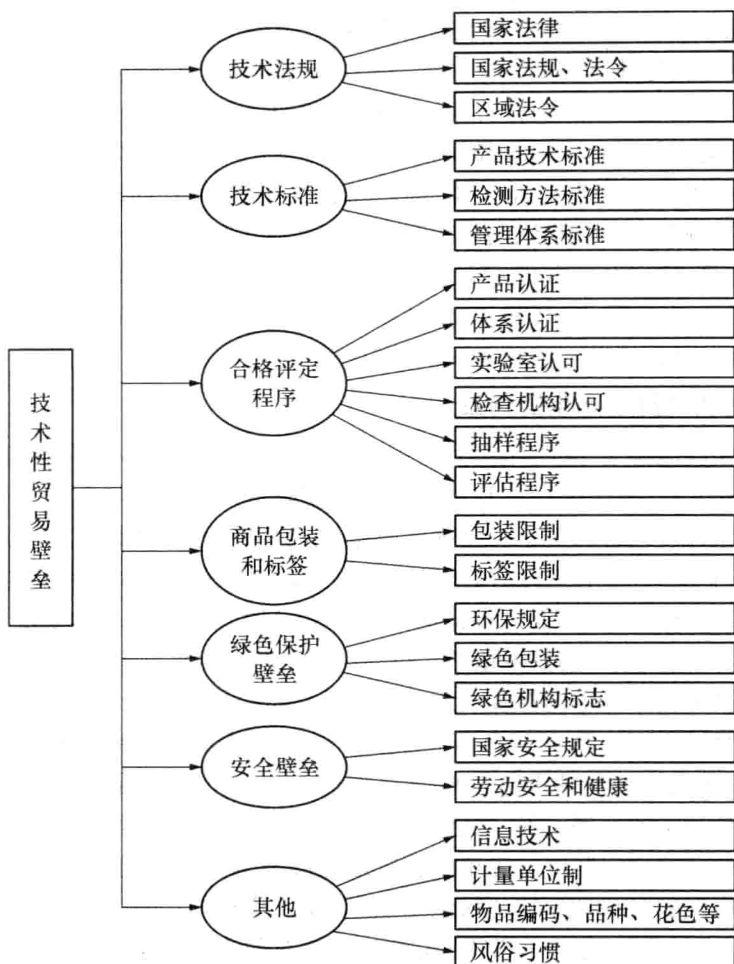


图 12-1　技术性贸易壁垒构成总示意图

热内卢联合国环境与发展会议《21 世纪议程》建立的。我国 2002 年成为 GHS 分委会正式成员。GHS 的宗旨为了世界各国统一认识化学品危害性，共同利用各国对化学品危险性的科学研究成果；采取有效预防和控制措施，减少化学品危害；保护人类健康和环境。主要工作是在综合世界各国化学品分类和标签体系的基础上，来规范化学品的分类、安全技术说明书和安全标签，形成对化学品分类和同类化学品分级及标签的全球统一制度。GHS 涉及化学品生产、储存、使用；为保护消费者、一般公众、工人、运输和应急人员。其分类依据包括流行病学调查、测试数据、估算数据、人类经验等。但是，鉴于很少化学品有流行病学调查资料，大多化学品分类要以测试数据为基础。数据要求按 GLP 规范和标准的测试方法(紫皮书 A9.2.6)获得。

(三) 化学品国际贸易的需要

实验室认可对产品认证提供技术保障。因此，数据质量问题是一个产品很重要的考量尺度。如果世界各国的相关管理机构能够采用其他国家的安全性试验数据，就政府和工业企业而言，能够避免重复实验，节省实验成本；而且，共有的 GLP 准则可以促进信息交流，防止贸易非关税壁垒。

技术性贸易壁垒(technical barriers of trade，TBT)是国家与国家之间进行商品交换时，商品进口国在实施贸易进口的管制中，通过颁布法律、法规、条例、建立技术法规、标准、认证制度、检验制度等方式，对进口产品制定过分严格的技术标准、卫生检疫标准、包装和标签标准、“绿色保护”等要求，从而提高进口产品的技术要求，增加进口难度，最终达到限制进口国进口产品到本国的一种非关税壁垒的措施(图 12-1)。由于技术性贸易壁垒是由技术要求、标准、合格评定构成，主要是为了保护国家安全及消费者利益，因而有合理的一面；世界贸易组织(WTO)/TBT 协议并不是否认各成员国技术壁垒的存在合理性和必要性，但反对其妨碍正常的国际贸易和不得有歧视性。由于科技及检验手段的不断发展，技术壁垒多样化的出现，为灵活应用技术壁垒提供了条件和可能。由于技术壁垒往往是在保护环境、保护健康、保护安全、保护植物和消费者权益为名义再现，合法、合理，一旦本国经济萧条或进口商品影响本国生产者利益时，在直接贸易限制被取消后，技术壁垒成为“最客观、中立、合法”的因素。

欧盟委员会于 2008 年 5 月提出关于化学品注册、评估授权与限制法规(Regulation Concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals, REACH)，将欧盟市场上约 3 万种化工产品和其下游的纺织、轻工、制药等 500 多万种制成品全部纳入注册、评估、许可 3 个管理监控系统。要求所有化工产品必须提供化学品的健康危害和环境危害数据，而所有检测数据应来自通过 GLP 认可的实验室。

欧洲经济共同体(European Economic Community, EEC)致力于欧洲法律的协调，由议会指导协调有关履行 GLP 工作的法令、法规和管理措施。1987 年颁布 GLP 法规和准则。此后，OECD 和 EEC 又对 GLP 法规进行了多次增补和修订，但两者 GLP 的原则一致。为了促进登记资料要求的协调一致，减少昂贵的、重复的实验，避免非关税贸易壁垒，降低登记成本，提高经济效益，并使 GLP 在国外也获得认可，在许多进行化学品贸易的国家之间签署了谅解备忘录(memoranda of understanding, MOU)。例如，从 1981 年开始在 OECD 成员国之间实行“安全性资料相互认可”(mutual acceptance of safety data, MAD)制度，目前 OECD 的 30 个成员国都已实行互认。由于这种资料互认具有互惠互利的优越性，非 OECD 成员国家要求参加资料互认的兴趣日益增大。1997 年 11 月 26 日 OECD 第 912 次理事会议通过“关于接纳非成员国加入化学品评价数据互认的决议”。但是，非 OECD 国家加入 MAD 需按以下要求和程序：第一，本国必须建立 GLP 执行和监控体系；第二，由相关政府部门向 OECD 递交申请；第三，提交 OECD 理事会讨论进入正式加入程序；第四，由 OECD 选派成员国专家联合到申请国进行符合性检查；第五，在 GLP 工作组会议上审议通过并报 OECD 理事会批准。由于实行资料互认的前提是实验数据必须产生于符合 OECD 准则要求的 GLP 实验室，目前 OECD 的 GLP 准则已作为国际标准在世界范围内得到广泛承认和实施。适用于药品、工业化学品及杀虫剂等。

我国现有农药生产企业 2 300 多家，农药品种 600 多种，农药产品 2.7 万多个，已成为世界最大农药生产和出口大国，2011 年我国农药产量为 226.22 万吨，出口量为 104.3 万吨。但在我国农药出口的众多产品中，具有自主品牌却寥寥无几。造成这种局面的主要原因之一是我国安全性评价体系尚未得到国际认可，实验数据得不到承认；而要获得境外登记，就必须重新进行并提交 GLP 实验室出具的实验数据，且登记时间长、费用高，使农药出口贸易的发展受到很大制约。由于我国农药安全性评价实验数据得不到 OECD 国家和相关国际组织的认可，我国在参与农药国际标准制定和解决农产品国际贸易争端等方面难以掌握主动而有效应对。自 2001 年我国加入 WTO 后，发达国家对我国实行绿色技术壁垒，使我国具有比较优势的劳动密集型产品如蔬菜、畜产品和水产品出口频频受阻损失较大。

(四) 提高实验室自身的管理水平和技术能力的需要

建立质量体系是申请实验室认可和接受外部评审的前提条件。认可是权威机构对某一组织或个人有能力完成特定任务做出正式承认的程序。实验室认可是由经过授权的认可机构对实验室的管理能力和技术能力按照约定的标准进行评价,并将评价结果向社会公告,以正式承认其能力的活动。质量体系是外部对实验室的能力和水平做出评价的依据。因此,建立质量管理体系是实验室提出认可申请的基本条件。

建立质量体系是实验室迅速提高内部管理水平的有效办法。在市场经济中,检测实验室是为政府机构、社团组织和贸易双方提供检测服务的技术组织。一方面,随着新产品的不断涌现、检测对象的多样性和复杂性对检测技术提出了更高的要求,如何保证检测结果的可靠性成为检测实验室最重要的工作内容;另一方面,关于产品质量的诉讼逐步增多,检测机构出具的数据成为划分责任的重要依据,因而检测数据的可靠性和实验室的公正性越来越成为社会大众关注的焦点。检测实验室为了保证向客户提供的检测服务具备科学性、公正性和准确性,就必须建立完善的组织结构并施行高效的质量管理体系。

建立质量体系是实验室扩大知名度、增强竞争力的最佳途径。实验室认可是目前国际上通行的制度。实验室获得认可后,表明实验室具备了按有关国际准则开展校准/检测的技术能力;增强实验室在市场的竞争能力,赢得政府部门和社会各界的信任;获得了与签署互认协议方国家和地区实验室认可机构的承认;有机会参与国际间实验室认可双边、多边合作,从而得到更广泛的承认。目前,实验室认可在国际和国内逐步得到重视,一个没有获得权威组织认可的检测实验室所出具的报告,已经很难获得政府部门和质量诉讼双方的信任。

第二节　良好实验室规范

GLP 是用于规范与人类健康和环境有关的非临床安全性研究的一整套组织管理体系,包括实验计划、实验实施过程、实验的监督、记录、档案和报告的管理。GLP 是一种由政府行政管理部门制定和发布的法规性文件,是阐述保证所做的总结报告全部资料质量及完整性的最低要求的方法和步骤。其目的是组织和管理科学技术人员的研究行为,对实验资料的质量进行严格控制,促进科学家提高实验数据的质量和有效性,从而帮助科学家避免假阴性或假阳性结果出现,能找到支持报告结果的原始资料,保障实验结果的可靠性、完整性和可重复性。实施 GLP 可避免技术上的不统一性,使不同实验室及国家实验室结果具可比性,促进实验数据的国际上相互认可,避免重复性实验,减少资源浪费。GLP 是一种有信誉的促进人类健康和环境保护作用的工作。GLP 不是评价实验的内在科学价值,例如:应该进行什么实验、实验方案的科学内容等,而是一套组织管理要求。因此,其主要原则是帮助科学家得到的实验结果具有可靠性(reliable)、可重复性(repeatable)、可审核性(auditable)和可被承认(recognized worldwide)。与实验室认可一样,实施 GLP 是一个国家综合实力与发展水平的体现,是科技水平、管理水平与社会综合体系水平的集中体现。

一、GLP 的基本精神

1. *提高生物试验数据的质量,避免偶然发生的变动*　众所周知,生物实验不同于理化实验,受多种因素的影响,大致可分为以下 3 个方面。

(1) 绝对变动因素：非人为控制的机体本身及环境因素，如季节性、性周期、24 小时节律、伴随营养、发育带来的变动称之为绝对变动因素。这种变动具有一定的规律性及变动范围。

(2) 相对变动因素：由实验处置(如给药、手术、实验感染、禁食等)产生的机体反应，如药物所致食欲不振等各种反应，禁食产生的血糖下降，肝糖原减少等，称之为相对变动。这种变动多数是可以预知的，并且是可以控制的。

(3) 偶然发生的变动因素：因生物本身的质量或环境因素所致的自然感染及实验操作误差、忘记给食水、供试品的配制和实验记录差错等引起的实验数据的变动称之为偶然发生的变动。这种变动没有规律性和重现性，也很难追踪其变动原因，是影响生物实验质量的主要因素。因此，最大可能地排除偶发的变动，得到有质量保证的生物实验数据是 GLP 基本精神之一。

2. *只有保证了原始数据的准确可靠才能保证生物实验报告的质量* 人们知道，评估某一商品的质量是凭它的外观、造型、功能及耐用性。生物实验报告则不同，其实体是原始数据，只有在保证原始数据的准确可靠基础上，才能保证生物实验报告的质量。这是 GLP 的基本精神之二。

3. *提高国际上安全性实验数据的相互利用率* 经过几十年的发展，GLP 已成为国际上化学品安全性实验研究共同遵循的法规。凡在国际公认的 GLP 实验室里实施的安全性实验，其数据具有通用性，这样既节省了人力、物力及新产品开发时间，同时也降低了新产品的价格。这是 GLP 的基本精神之三。

二、GLP 涉及的范围

所谓 GLP 涉及的范围是指纳入 GLP 实验室评价的产品或受试物和安全性试验的项目。之所以要设定范围：一方面，一个 GLP 研究项目的成本和费用通常可能要比与非 GLP 研究高出 20%～40%，因此主要用于对拟申报上市的各种新产品的毒性研究或拟提交行政审批毒性资料的研究；另一方面，由于 GLP 研究是要严格按照管理规范和指导原则实施的，它不但提出标准和要求，还提供非常具体的操作程序因而可能会束缚或限制科技人员的创造性，并不适合所有的毒理学研究或实验。

(一) GLP 规范的管辖范围

1. OECD 医药品、动物用医药品、植物保护剂、杀菌剂、饲料添加剂、新合成的和已经有的化学物质、食品添加剂、化妆品。

2. *美国* FDA 食品添加剂、色素添加剂、饲料添加剂、人用药物和兽药、生物制品、人用医疗器械、电子产品；美国 EPA：农药、杀真菌剂和灭鼠药对生态的影响，在现场和实验室研究化学品对健康、环境的影响和化学品的可否使用，残存化学品在现场和实验室的有效性研究。

3. *日本* 到目前为止根据被检物质已建立了 8 个 GLP：①医药品 GLP(厚劳省 1982 年 4 月)；②化审法 GLP(1984 年 3 月)；③安卫法 GLP(厚劳省 1988 年 9 月)规定了根据化学原料生产吨数，要求对环境和人体的可能有害性进行报告；④农药 GLP(农水省 1984 年 9 月)；⑤动物用医药品 GLP(农水省 1997 年 11 月)内容同医药品 GLP(厚劳省 1982 年 4 月)；⑥饲料添加剂 GLP(农水省 1988 年)；⑦环境省 GLP(1995 年 9 月)主要针对水生生物的安全性评价；⑧医疗器械 GLP(厚劳省 2002 年 9 月公布，2003 年 10 开始实施)。

(二) GLP 实验室的实验范围

由于不同国家和机构对不同受试物的要求有所不同，其实验范围也有差异，通常要求在 GLP 实验室完成的、各管理机构针对不同受试物制定的技术指南中推荐的实验项目均应纳入

GLP 的实验范围。

(三) GLP 的常用术语和定义

1. 项目负责人或称专题负责人(study director, SD) 负责某项非临床健康和环境安全研究的全面实施的人,是某项研究的唯一控制者,并最终负责全面地、科学地执行研究工作。这是 SD 的主要任务。GLP 原则中规定的义务和职责都来源于这一主要任务。因为经验显示,只有将正确开展研究的责任委派给一个专门人员负责,才能避免研究人员因接收到相互冲突的指示而导致研究计划的不良执行。在任何特定的时间对于一项研究只可能有一名项目负责人。SD 的一些职责可以被委派,例如在分包合同研究中,但 SD 最终作为研究的单一中心控制者的职责不能被委派。从科学的角度来讲,SD 通常是负责设计和批准研究计划,监督数据的收集、分析和报告的技术专家。SD 负责根据研究得出最后的总结论。从管理的角度来讲,SD 应向管理者申请资源(如人员、设备与设施)并进行协调,以确保预期的研究进程能够正常开展。各国 GLP 中对 SD 职责的规定略有差异。SD 是由 GLP 机构或实验室的负责人聘任、任命或指定的。

2. 质量保证部门(quality assurance unit, QAU) 安全评价研究机构内履行有关研究工作质量保证职能的部门。

3. 实验系统(test system) 用于毒性实验的动物、植物、微生物以及器官、组织、细胞、基因等。

4. 标准操作程序(SOP) 记述 GLP 实验室内常规试验有关的各种工作程序、技术方法及管理等的一套内部的法规性文件。目的是使 GLP 实验室内各项工作有章可循、工作有序、互相衔接、密切配合,确保试验结果的真实性、完整性和可重复性,出现异常情况时便于查找原因。

5. 研究计划(study plan) 某项研究的发生、执行、管理、报告和监控(monitor)的整个计划,包括设计方案(protocol)、程序和安排(schedule)、人员和经费和材料以及研究质量监控计划等部分。

6. 研究起始日期(study initiation date) SD 签署实验设计方案的日期。

7. 研究终止日期(study termination date) SD 签署正式实验报告的日期。

8. 实验开始日期(experimental start date) 采集第一次研究数据日期。

9. 实验结束日期(experimental termination date) 采集最后一次研究数据的日期。

10. 受试物(test substance or mixture) 实(试)验研究中给予或加进实验系统的物质或混合物。受试物可以是:①为申请产品研究或上市进行的实验研究中的对象材料,或准备上述申请的研究对象材料;②研究对象材料的组分、杂质、降解物、代谢物;或者是某些与受试物有关,并且有助于研究其毒性特征、代谢或受试物其他特征的物质。

11. 对照物(control substance) 研究过程中使用的除了受试物、饲料和水以外的任何化合物、混合物及其他材料。研究过程中给予实验系统这类材料的目的,是为了确立与已知的受试物化学和生物参数比较的基础。

12. 参照物(reference substance) 研究过程中给予或用于分析试验系统除受试物、饲料和水任何化合物或混合物、分析标准及其材料。应用参照物的目的同对照物。

13. 载体/溶媒(carrier/vehicle) 载体是包括(但不限于)饲料、水、土壤、营养基等在内的任何物质,常指与受试物混合给予试验系统的各种物质。溶媒指研究过程中用来促进受试物混(合)匀、弥(分)散或溶解和各种试剂。

14. 原始资料(raw data) 研究过程中所有的实验记录、备忘录(内部通讯)、整理记录、笔

记、或者原样复印和原稿副本。只有与原件一致、标注日期、并且核实签字的原样复印或原样副本才可以替代原始资料。“原始资料”也包括照片，缩微胶片或照片、计算机打印件、录（音）像资料、口笔录观察以及自动化仪器的记录打印资料等。可以是单位或者是个人，通常是单位。可分3种情况：①研究的发起和资助单位，负责提供经费或其他资源；②向政府管理单位（EPA，FDA）提交正式实验研究报告的单位或个人；③发起并且实施该项研究的实验（室）所或其他机构。

三、GLP为保证数据质量所采取的措施

如上所述，GLP是一种质量系统，关注的是非临床健康和环境安全研究的过程和条件，包括计划、执行、监测、记录、档案和报告。通过建立一套以质量（quality）、可信性（reliability）和完整性（integrity）为基础的管理机制，达到结论是可检验的，数据是可追踪的目的。

（一）构成要素

对构成实验室要素即人（工作人员）、设备（设施、设备、仪器）、材料（实验模型、受试物、试剂、饲料、饮水）、方法（试验方案、SOP）提出明确要求和制定相应的管理制度。

首先是训练有素的人员（trained personal）。从业务素质上讲，训练有素的人员应包括“三历”，即学历（education）、资历（qualification）和经历（experience）。GLP要求学历具有证书（diplomas），资历具有广博的知识（extensive），经历是专业的（professional）。三者要兼顾、互补，并非学历一定要最高，低学历可以专业经历补充。每一个进入GLP实验室工作的人员应不断接受内部和外部的专门训练，以补充其简历和职业生涯中的不足。要求所有人员必须理解GLP，它的重要性及其在GLP活动中自己的职业地位。培训以SOP为基础，尤其在新的课题与活动前，更应接受一些培训。此外，也应进行一些专业进展性的培训。任何培训应是正式的、标准的，经权威部门批准而颁发证书的。

第二是合理结构的实验室。其总原则是合适的大小、结构和位置，以满足研究的需要，以及减小对研究真实性的干扰。因此，合适的大小必须考虑的是：①能容纳的工作人员数；②工作人员能无危险地进行工作；③降低实验材料间的相互混杂和交叉污染。合适的结构要求：①建筑材料易于清洁，不至于造成受试物的积聚和交叉污染；②具备通风系统以保护工作人员和防止交叉污染；③按功能合理地分隔。并且，应有专门的动物场所。

第三是满足实验的基本设备。一是与所进行的研究相适应的设备，二是与设备本身的用途相适应，而不是“替代品”。并且，设备应经常维护，使设备保持在原规格范围，降低损坏和数据丢失的可能性。维护应有定期的计划内维修，尤其是大型设备，也应有偶发故障时的应急措施，还应有必要的备件。某些设备如有早期警示装置，则将更有利于使用者。一件达到规格的仪器设备，可保证产生符合要求的数据，故按时校验极为重要。任何设备的维护与校验应有详尽的记录。

（二）文书化保证

实验方案、实验实施至实验总结报告的全过程必须以文书的形式记录，实验操作必须以实验方案及SOP为依据，使任意一个实验操作细节都有据可查。在法律体系完备的国家，GLP是与法律机制相结合的。如在ICH协议各国内部，GLP实施过程所产生的各种原始记录必须证据化。换言之，在新药非临床研究过程中所产生的各项原始记录和数据必须具有法律证据的客观性、关联性和合法性，其作为法律证据的资质证明力，必须经过公证、鉴定和认可，构

成一个闭合的证据链，用以证明研究资料的可靠性和真实性。当一项研究的研究过程所形成的法律文件被证明不真实时，当事人和负有责任者将会被指控为伪证罪，使用这些文件者也面临欺诈罪的指控。

（三）QAU 的保证

实施 QAU 是 GLP 为保证实验数据质量采取的主要措施。GLP 规定最低质量保证的要求是保证研究的完整性和实验结果的可信性。由实验单位的质量保证部门（QAU）和上级有关部门以“第三者”的身份客观地对实验设施、GLP 运转状态、实验操作及原始数据进行审查。

四、GLP 的主要内容

（一）GLP 实验室的组织机构形式

国际上目前主要有以下 3 种模式。

（1）GLP 实验室依托于某一机构如学校或研究所，功能单位以该实验室为主，依托机构的其他一个或几个科室（或部分）可作为某一个或几个功能单位的组成，QAU 人员由依托机构任命并对依托机构负责。

（2）GLP 实验室依托于某一机构如学校或研究所，由该实验室的各功能单位单独组成，其他科室不参与，QAU 人员由依托机构任命并对依托机构负责。

（3）相对独立的 GLP 实验中心，所有功能单位均属中心，QAU 人员由中心主任任命并对中心主任负责。

（二）研究项目的组织和管理

1. *机构负责人及其职责*　任命、指定和更换专题负责人；确保质量保证单位履行职能；提供人力、物力、财力等方面的保证；确认各种错误或过失得以纠正；对研究人员和质保单位之间的争议作出裁决。

2. *SD 及其职责*　设计签署实验方案及其他正式文件并且注明日期。保证所有实验资料，包括意料之外的实验反应，都被准确地记录并核实。当实验过程中某些可能影响研究质量和结果一致性的未预料到的情况发生时，及时采取措施（行动）补救，并且立即如实记录。确保 GLP 的各项规定都遵守执行。保证所有的原始资料、文件、实验设计、标本及正式实验报告按档案材料保存和管理。签署正式研究报告，按照国家法规规定签署遵守声明（compliance statement）。

3. *质量保证单位及其职责*　保存实验机构的主计划表（master schedule）、实验方案（protocols）和 SOP（各 1 份）。研究进行期间对研究项目多次监察，以确保研究的一致性。记录和签署每次监察的问题和发现，立即口头知会 SD 或提交书面报告，陈述所发现的问题以及采取的相应措施；审定无未经批准或记录的偏离实验方案和 SOP 的情况发生或出现；审校正式实验报告，确保报告中对研究方法 SOP 的描述准确无误，实验结果确实是原始资料整理分析的结果；撰写和签署附在正式报告的质量保证声明（图 12－2）。

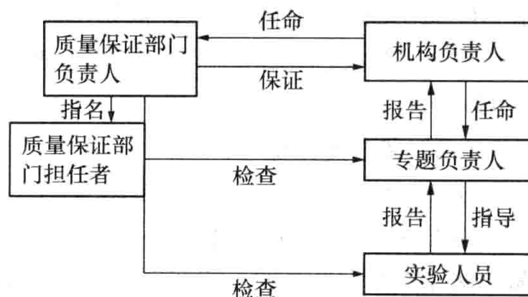


图 12－2　GLP 的组织系统

(三) 实验设施和仪器设备的规定要求

1. 实验设施　实验机构具备足够的实验动物房间或者其他实验系统区域，以使：①不同种属的动物或实验系统分别饲育；②不同的项目分离饲育；③检疫动物；④建立常规或特别的动物饲育系统。

实验机构应有足够的动物房间或其他试验系统区域，以分别隔离那些用已知有生物危害的实验系统、受试物、对照物或参照物，包括易挥发物质、气溶胶、放射活性材料以及感染性（传染性）微生物。

隔离的房间或区域应有诊断、处理和控制实验系统/动物疾病的装置。应有效地隔离有疾病、疑有疾病或疾病携带的实验系统/动物的房间或区域。

实验设施应有和排放污染的水、土壤或其他材料的能力。如存养动物，则应有收集和处理所有动物废物和排泄物的能力，或者具有安全消毒的装置。

实验设施应按实验设计方案要求，具备调控环境条件如温度、温度、光线等能力。

对用海洋水生物的机构，应具备充足的清洁海水或人工海水（以脱碘水或蒸馏水配制），其成分组成应该与实验设计方案一致。对淡水生物，则应按实验设计方案备足硬度、pH、温度适宜，并且不影响实验结果的清洁水。

如用植物作为实验系统，实验设施就按实验设计方案之要求，供有组成合适的土壤。

2. 仪器设备　根据研究工作的需要配备相应的仪器设备，放置地点合理，并有专人负责保管，定期进行检查、清洁保养、测试和校正，确保仪器设备的性能稳定可靠。实验室内应备有相应仪器设备保养、校正及使用方法的SOP。对仪器设备的使用、检查、测试、校正及故障修理，应详细记录日期、有关情况及操作人员的姓名等。

(四) SOP的制定和执行

1. 种类和制定过程　SOP是GLP实验室的软件，是GLP管理人员和实验人员所遵循的文本；是记述GLP实验室内常规实验有关的各种工作程序，技术方法及管理措施的一套内部法规文件。编写和建立一套合乎GLP要求，合乎本研究机构实际情况的SOP是GLP建设的主要内容；在进行GLP实验室建设时，往往先从制定SOP开始。目的是使GLP系统内各项工作有章可循，互相衔接、紧密配合，确保实验结果的真实性、完整性和可重复性，出现异常现象时便于查询原因；其特点是为各个GLP实验室所独有，适应自己实验室条件；SOP需要在实践中不断加以完善和修订；SOP的编写、修订和管理过程本身也应有相应的SOP来加以规范；可操作性强，简单明确、以能使具备专业知识，经过培训的人员能理解和掌握为原则。凡是实验设计方案中没有详细说明的常规方法和操作程序，都应该制定SOP。需要制定的SOP主要包括以下方面：SOP的编辑和管理；质量保证程序；供试品和对照品的接收、标识、保存、处理、配制、领用及取样分析；动物房和实验室的准备及环境因素的调控；实验设施和仪器设备的维护、保养、校正、使用和管理；计算机系统的操作和管理；实验动物的运输、检疫、编号及饲养管理；实验动物的观察记录及实验操作；各种实验样品的采集、各种指标的检查和测定等操作技术；濒死或已死亡动物的检查处理；动物的尸检、组织病理学检查；实验标本的采集、编号和检验；各种实验数据的管理和处理；工作人员的健康检查制度；动物尸体及其他废弃物的处理；需要制定SOP的其他工作。

2. SOP的格式和内容　每一种SOP都必须有各自的编号（码），并且署明部门、版本和副本数目；SOP的名称（题目）和生效日期；制订者、确认者和批准者的签字及签署日期；该SOP

的目的，涵盖范围以及文中所用术语的定义；材料，操作程序和过程；转换和计算方法；报告要求，并将文中“材料”部分和报告的格式（常用表格式）作为SOP之附件；分发和保存的规定与要求；负责此SOP的有效性，并且监督其遵守执行的人员；该SOP的复审和修订计划；意外事件的补救对策；保密要求；参考文献和附件，包括各种表格。

（五）实验设计方案及其主要内容

实验设计方案（protocol）的主要内容应该包括：项目名称和研究目的；受试物、对照物和参照物的名称、化学文摘号（CAS）或者其他代码；实验委托者（保证者）和实（试）验实施机构的名称和详细地址；实验起始和终止完成日期；实验动物/实验系统的选择及其理由；尽可能地写明实验系统的种属（系）、年龄、性别，以及实验系统的来源；实验系统的鉴别方法和鉴别程序；描述具体实验设计，包括控制偏倚方法；说明实验期间所用饮料、溶剂以及用以助溶或混悬的其他材料。对于饮料中可能出现的污染物，要详细说明这些污染物的特性，可能影响实验结果的含量（浓度），以及实验过程中可以容许的含量（浓度）；染毒途径及其选择理由；染毒剂量/浓度单位。受试物、对照物和参照物的给予方式和次数；实验、分析和测定（量）的方法和次数；需要保存的记录和资料；委托方、质量保证部门负责人和专题负责人的准备签署日期；对研究中所用的统计处理方法加以说明。

（六）研究工作的实施

每项研究均应有专题名称或代号，并在有关文件资料及实验记录中统一使用该名称或代号。实验中所采集的各种标本应标明专题名称或代号、动物编号和收集日期。SD应制订实验方案，经质量保证部门审查，机构负责人批准后方可执行（OECD规定由SD批准），批准日期作为实验的起始日期。接受委托的研究，实验方案应经委托单位认可。研究过程中需要修改实验方案时，应经质量保证部门审查，机构负责人批准。变更的内容、理由及日期，应记入档案，并与原实验方案一起保存。SD全面负责研究专题的运行管理。所有数据的记录应做到及时、直接、准确、清楚和不易消除，并应注明记录日期，记录者签名。

（七）研究资料的收集

原始数据是在研究过程中的原始记录，它是证明在一定时间进行了某项研究的唯一途径。因此，不仅要包括数据（结果）的产生，还要提供在正确的时间，正确地进行了实验的程序。原始数据也是检查者再现该项研究的必须要素。原始数据应符合下述要求：identified（被确定或审核的数据或结果）、directly（第一次写下的记录）、promptly（操作完即刻记录）、accurately（精确）、legibly（明了，能读懂）、indelibly（擦不掉）、signed（实验者签名）和dated（签名日期）。如须修改，应注明修改理由，由谁在什么时间修改。对自动记录的各种资料，应逐个记录日期、时间和仪器操作人；如须改动，同样不准在原记录上“涂改”（obscure）。要注明改动理由、改动人并署名改动日期。

原始记录必须用装订成册的实验记录本。原则上不得有空白页，所有空页（处）要斜划注明“空白”，或者在最后一页加以特别说明。如某部分原始资料与多项课题有关，可以复印（制）副本。每份副本均须注明“原样副本”（一般盖章），由复印（制）人签名和署日期并且说明原件在何处存放。我国食品药品监督管理局还专门颁发了药品研究实验记录暂行规定，提出了详细具体的要求。

（八）正式实验报告的基本内容和要求

正式实验报告（final report）原则上应有以下项目和内容。

(1) 实验实施机构的名称和地址:实(试)验的起始日期、完成日期或者终(停)止日期。

(2) 设计方案中确定的研究目的和程序以及研究过程中对设计方案的任何修改和变更。

(3) 用于分析实验数据资料的统计方法(必须与设计方案的相应部分一致)。

(4) 受试物、对照物和参照物的名称,化学文摘号或其他编码。这些物质的强度、纯度、组成及其他理化特性,以及它们在实验条件下的稳定性和溶解度。

(5) 描述说明实(试)验方法、实验系统和染毒剂量。对于实验系统的描述应包括动物数目、性别、体重范围、种属(系)、年龄和来源,以及标记和鉴别动物的方法等;染毒剂量应同时说明剂量、给药次数和间隔时间,染毒途径和持续时间等。

(6) 描述和说明所有可能影响数据资料的质量和一致性的环境条件因素。

(7) SD、机构负责人和所有参加项目的专业人员的姓名。

(8) 数据资料的转换、计算及统计处理。资料的分析与总结,以及由资料分析而得出的结论。

(9) SD、委托方和质量保证部门负责人、机构负责人签字和签署日期。

(10) 标本、原始资料和正式报告和存放地点。SD 和质量保证部门的声明(statement)。

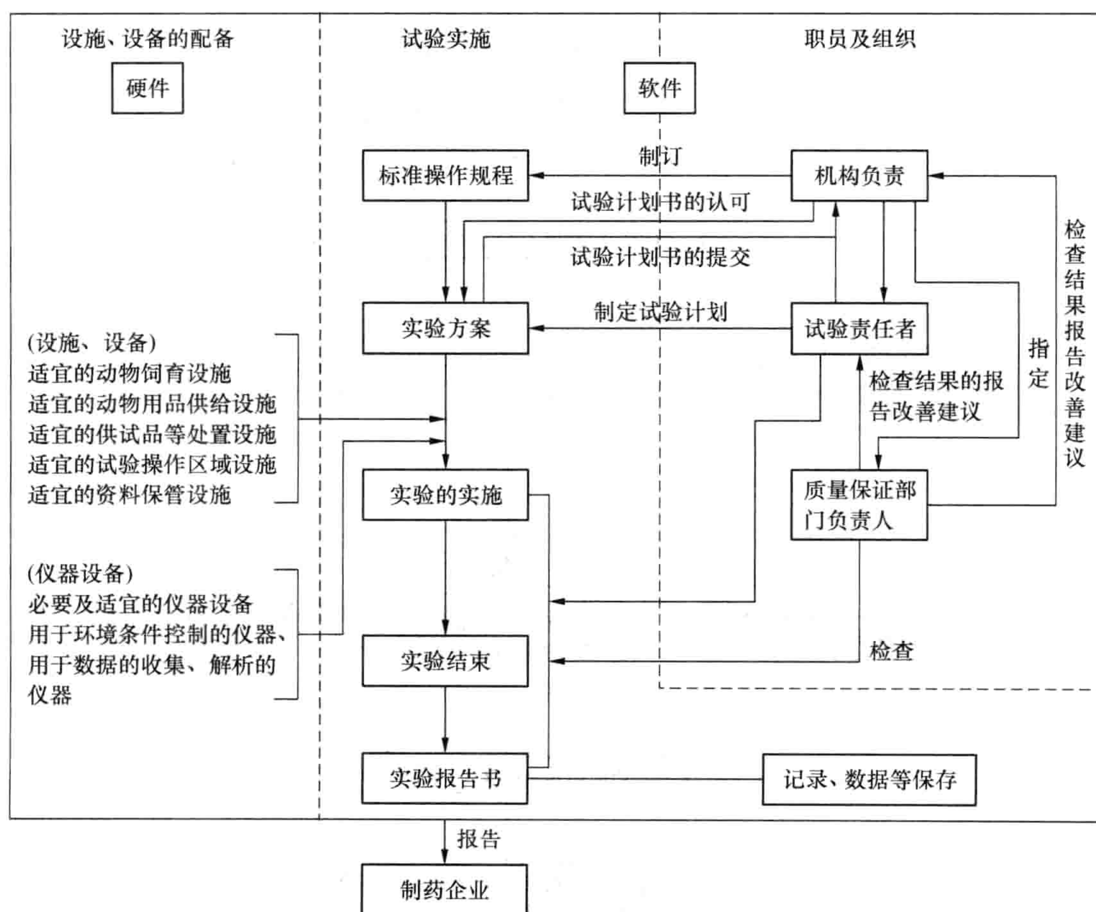


图 12-3 GLP 实验流程图

(九) 研究资料的保管、存贮和检索

研究工作结束后，专题负责人应将实验方案、标本、原始资料等按 SOP 的要求整理交资料档案室，并按 SOP 的要求编号归档。

档案管理并不是材料的收集与贮藏，它也是信息资源、组织手段、文件分布和编辑的实体。档案管理应包括研究资料、系统资料和质量保证文件。资料档案室应有专人负责，按 SOP 的要求进行管理，如明确有权进出档案材料保管区域的人员，限制其他人进出该区域；建立登记制度，借阅档案材料要严格登记；建立便于检索的索引系统；分类管理各类档案材料，严格执行保存期限的规定；保管区域的环境条件要适宜于档案材料的长期保存，应有防火设备和防虫蛀措施，以及紧急情况下的转移疏散方案等。

五、GLP 实验室的认可

GLP 实验室认可一般有以下程序：①申请认可；②提交认可的资料；③通知检查时间；④进行现场调查；⑤评价调查结果；⑥向申请者通知调查结果；⑦评价、颁发 GLP 合格证书。不同机构对 GLP 实验室认可要求和程序略有差异。国家认证认可监督管理委员会(CNCA) GLP 实验室的认可符合性评价流程见图 12-4。

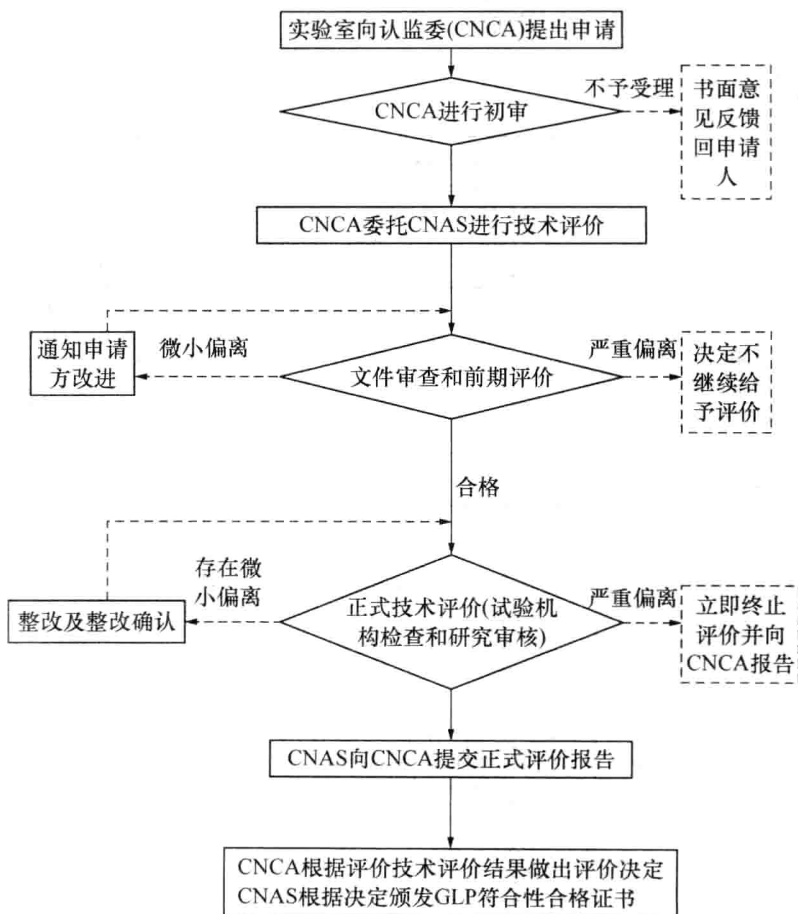


图 12-4 良好实验室规范(GLP)符合性评价流程图

第三节　GLP 质量管理体系在我国的应用现状和展望

我国与化学品 GLP 相关的政府管理部门及其职能分工为:国家食品药品监督管理总局负责食品/药品/医疗器械/化妆品等登记管理,由药品认证管理中心承担药物 GLP 监督实施的具体工作;农业部负责农药、兽药和饲料的登记管理,由农业部农药检定所和中国兽药监察所分别承担 GLP 监督实施的具体工作;国家环境保护部负责新化学品的登记管理,由有毒化学品登记中心承担 GLP 监督实施的具体工作;国家认证认可监督管理委员会(CNCA)作为实施国家认证认可工作的部门,其承担工业化学品实验室的认可工作。依据国家相关法律法规和国际规范开展 GLP 符合性评价工作。CNCA 授权中国合格评定国家认可委员会(CNAS)作为技术评价机构开展 GLP 符合性评价的技术评价工作。另外,2008 年国家质量监督检验检疫总局和国家标准化管理委员会颁布了 6 个食品安全检测实验室质量控制规范的国家标准。标准由国家认证认可标准化技术委员会提出并归口。2011 年国家质量监督检验检疫总局发布了我国出入境检验检疫行业标准《化学品毒理学安全性评价良好实验室规范》,该标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。但目前尚未见开展食品毒理学检测和进出口化学品毒理学安全性评价 GLP 实验室的认可公告。

一、药品

药物 GLP 是我国开展最早,目前发展最好的。体现在从事药物安全性评价的 GLP 机构和人员较其他化学品的多,无论是硬件还是软件都较好,执行 GLP 规范的符合性高。

(一) 应用发展概况

1991 年 3 月,国家科委组织起草药物 GLP。1993 年 12 月 11 日由国家科委发布了《药品非临床研究质量管理规定(试行)》,1994 年 1 月 1 日开始试行。“九五”期间国家科委启动了“1035”工程,资助和扶持了几个 GLP 实验室的建设,改善了这些实验室的条件,为 GLP 的发展起到重要的推动作用。1996 年 8 月 6 日国家科委又印发了《药品非临床研究质量管理规定(试行)》实施指南(试行)和执行情况验收检查指南(试行)。国家科委颁布的 GLP 在一定程度上推动了我国 GLP 的发展,但当时 GLP 尚处在推行、指导和推荐阶段,也没有监督检查。

1998 年 6 月,国家药品监督管理体制进行了重大改革,成立了国家药品监督管理局,包括 GLP 在内的所有药品监督管理法规进行了执法主体的转移,GLP 由国家药品监督管理局安全监管司研究监督处主管,理顺了的管理体制,为 GLP 的发展创造了条件。1998 年 8 月召开了 GLP 专家座谈会,1998 年 10 月起重新修订 GLP。1999 年 10 月 14 日发布《药品非临床研究质量管理规范(试行)》1999 年 11 月 1 日起施行。2002 年发布征求对《药品非临床研究质量管理规范》(试行)修订意见的函。

2003 年 6 月 4 日国家食品药品监督管理局在征求修订意见后再次修订和正式颁布了《药物非临床研究质量管理规范》(局令第 2 号);2003 年 9 月 1 日正式施行。2003 年 8 月 1 日印发了《药物非临床研究质量管理规范检查办法(试行)》,并正式开始对实施 GLP 的实验室进行 GLP 检查。此举使中国 GLP 建设迈出了实质性的一步。

2006 年颁发关于推进实施《药物非临床研究质量管理规范》的通知;规定自 2007 年 1 月 1 日起,未在国内上市销售的化学原料药及其制剂、生物制品;未在国内上市销售的从植物、动

物、矿物等物质中提取的有效成分、有效部位及其制剂和从中药、天然药物中提取的有效成分及其制剂;中药注射剂的新药非临床安全性评价研究必须在经过GLP认证,符合GLP要求的实验室进行。否则,其药品注册申请将不予受理。2007年颁布《药物非临床研究质量管理规范认证管理办法》和“GLP认证检查评定标准”,并开始以此为标准对各单位实施GLP检查。使GLP检查过程更加公开、公平、公正。

目前为止已有50余个实验室通过了GLP检查。

(二) 与其他国家或组织GLP的主要差异

1. 适用范围　各国的GLP适用的范围不尽相同。美国FDA适用范围包括色素和食品添加剂、饲料添加剂、人用药品、兽用药品、生物制品、人用医疗器具、电子产品等;OECD包括工业化学品、人用药品、兽用药品、化妆品、食品添加剂及农药等。中国的适用范围只限于人用药品。

2. 关于实验方案和实验总结报告的批准程序问题　有关机构负责人、专题负责人和质量保证负责人职责的条款中,明确规定机构负责人审查批准实验方案和总结报告,质量保证负责人审核实验方案和总结报告,而OECD GLP和日本GLP则不必经质量保证负责人的审查批准,实验方案的批准和总结报告的签署是专题负责人的职责,也可由专题负责人制定实验方案后,经委托方和机构负责人批准后开始进行实验。专题负责人负责整个研究的进行和总结报告的完成,并签署总结报告,而不需要质量保证负责人和机构负责人批准。机构负责人应确保专题负责人(SD)、主要研究人员(PI)和质量保证人员之间有明确的沟通途径。

3. 关于标准操作程序的批准程序问题　标准操作程序的制定、修改由机构负责人负责组织和批准,各国GLP均有类似的规定,但在标准操作程序的制定过程中是否应由质量保证负责人签字确认却存在不同意见,我国GLP规定标准操作程序经质量保证部门签字确认和机构负责人批准生效。OECD GLP和日本GLP则没有规定由质量保证负责人签字确认,并认为质量保证部门不参与标准操作程序的制定。

4. 关于实验的起始日期和结束日期　我国的GLP中规定,机构负责人批准实验方案和总结报告的日期分别作为研究的起始日期和结束日期,在日本的GLP中规定为专题负责人签署实验方案和总结报告的日期分别被定为研究的起始日期和结束日期,而OECD则分别规定了研究起始日期(study initiation date)、研究结束日期(study completion date)和实验开始日期(experimental starting date)、实验结束日期(experimental completion date),研究起始日期和研究结束日期分别定义为专题负责人签署实验方案和总结报告的日期,实验开始日期和实验结束日期则分别是采集第一次研究数据和采集最后一次研究数据的日期。

5. 其他　机构负责人的定义;机构负责人在多地点实验中的职责;机构负责人确保计算机系统与其预期的使用目的相适应,并经过验证;SD确保QAU能够及时获得已批准的实验方案和变更的复印件;QAU检查可以分为基于实验、基于设施、基于过程3种检查等在OECD GLP规范中有明确规定,我国的GLP无规定。

(三) 药物非临床研究GLP认证

GLP在药物研究和管理中称为药物非临床研究质量管理规范。GLP规范制定的依据是《中华人民共和国药品管理法》和《中华人民共和国药品管理法实施条例》,其宗旨是提高药物非临床研究的质量,确保实验资料的真实性、完整性和可靠性,从而保障人民用药安全。GLP认证是指国家食品药品监督管理总局对药物非临床安全性评价研究机构的组织管理体系、人

员、实验设施、仪器设备、实验项目的运行与管理等进行检查，并对其是否符合 GLP 作出评定。国家食品药品监督管理总局主管全国 GLP 认证管理工作，省级药品监督管理部门负责本行政区域内药物非临床安全性评价研究机构的日常监督管理工作。

药物非临床研究 GLP 认证，申请人需提交以下材料：《药物非临床研究质量管理规范认证申请表》；申请机构法人资格证明文件；药物研究机构备案证明文件；机构概要；组织机构的设置与职责；机构人员构成情况、人员基本情况以及参加培训情况；机构主要人员情况；动物饲养区域及动物试验区域情况；检验仪器、仪表、量具、衡器等校验和分析仪器验证情况；机构主要仪器设备一览表；标准操作规程目录；计算机系统运行和管理情况；药物安全性评价研究实施情况；既往接受 GLP 和相关检查和整改情况；实施《药物非临床研究质量管理规范》的自查报告；其他有关资料。许可程序包括：受理、资料审查与现场检查、审查及决定、送达（将行政许可决定送达申请人）（图 12-5，图 12-6）。许可证件有效期限为 3 年。认证不收费。

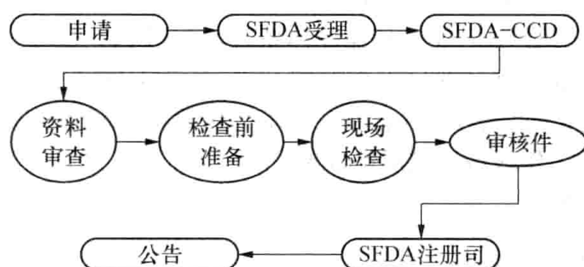


图 12-5　GLP 实验室资格认证程序

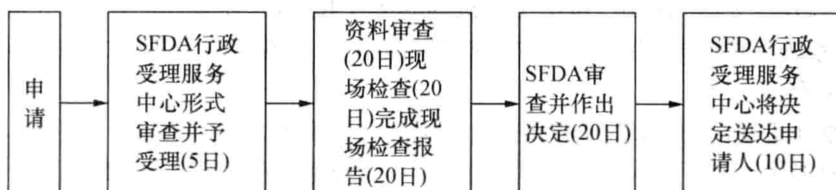


图 12-6　申办流程示意图

二、工业化学品

（一）应用发展概况

中国国家认证认可监督管理委员会（简称认监委）作为实施国家认证认可工作的部门，其承担化学品 GLP 实验室的认可工作，早在 2003 年欧盟发布新化学品正式法规提案时，国家质检总局和国家认监委就意识到实施 GLP 原则对我国出口产品的重要性，随即开展对 OECD 数据互认以及 GLP 原则体系文件的研究，跟踪 OECD GLP 工作组动态，2008 年开始筹建化学品 GLP 实验室的认可工作。

随着 2007 年 6 月欧盟 REACH 法规的正式实施，为了化解新的国际技术贸易壁垒，国家认监委从以下 3 个方面进行了 GLP 体系建设工作。

(1) 2008 年国家认监委组织 15 项 GLP 国家标准制定工作，该系列标准等同采用了 OECD GLP 系列文件，符合 OECD 数据互认协议（MAD）要求，并 2009 年 4 月 1 日正式实施。

15 项良好实验室规范国家标准的发布，可以有效地规范我国研究机构的研究活动，有利于尽快建立和完善我国的化学品安全评价实验室体系，满足欧盟 REACH 法规等国外法律法规关于化学品安全性的要求，为我国加入 OECD 的数据互认体系奠定了坚实的基础。

(2) 在 15 项良好实验室规范国家标准制定同时，国家认监委组织对 GLP 和评价程序相关文件的研究，随着国家标准通过审定，国家认监委公布了 GLP 及评价程序的有关文件，中国合格评定国家认可委员会(CNAS)决定将 GLP 评价体系纳入 CNAS 的体系；根据国家标准和上述文件，CNAS 制定了操作层面的文件体系，建立了完整的化学品 GLP 评价体系。2008 年 6 月国家认监委 2008 年第 17 号公告《关于公布良好实验室规范(GLP)及评价程序的有关文件的公告》，文件包括：①《良好实验室规范(GLP)原则(试行)》；②《良好实验室规范(GLP)符合性评价程序(试行)》；③《良好实验室规范(GLP)符合性评价申请书(试行)》；④《国家认监委良好实验室规范(GLP)评价的领域(试行)》。

(3) 为服务于我国的出口贸易，使我国产品在国内即可获得 GLP 实验室的检测服务，按照国际通行原则建立我国的 GLP 实验室监控体系，国家认监委从 2008 年 3 月开始组织开展 GLP 实验室评价试点工作。现场评价工作的顺利进行，标志着国家认监委建立我国 GLP 监控体系的工作迈出了重要的一步，也标志着我国工业化学品领域的 GLP 评价体系以及我国应对欧盟 REACH 法规的工作取得了实质性进展。

(二) 应用发展现状

1. 制定颁布系列的国家标准

(1) 良好实验室规范原则(GB/T 22278—2008)。标准等同采用 OECD GLP 原则和符合性监督系列文件 No. 1:《OECD GLP 原则》[ENV/MC/CHEM(98)17]。规定了 GLP 的相关术语和定义，以及主要技术规范，包括实验机构的组织和人员、质量保证计划、机构、仪器、材料及试剂、实验系统、试验样品和参照物、标准操作程序、研究的实施、研究结果的报告、记录和材料的存储与保管。

该规范原则所规定的 GLP 原则涵盖的非临床健康和环境安全研究，包括在实验室、温室与田间进行的工作。除了国家立法的明确豁免，本规范原则所规定的 GLP 原则适用于法规所要求的所有非临床健康和环境安全研究，包括医药、农药、食品添加剂与饲料添加剂、化妆品、兽药和类似产品的注册或申请许可证，以及工业化学品管理。

(2) 三项 GLP 监督部门指南分别为：①良好实验室规范监督部门指南第 1 部分:良好实验室规范符合性监督程序指南(GB/T 22274，1—2008)；②良好实验室规范监督部门指南第 2 部分:执行实验室检查和研究审核的指南(GB/T 22274，2—2008)；③良好实验室规范监督部门指南第 3 部分:良好实验室规范检查报告的编制指南(GB/T 22274，3—2008)。

(3) 7 项良好实验室规范实施要求标准：①良好实验室规范实施要求第 1 部分:质量保证与良好实验室规范(GB/T 22275.1—2008)规定了 GLP 原则下质量保证活动的具体内容和要求，包括质量保证人员的责任、质量保证管理人员的联系、质量保证人员资质及参与标准操作程序和研究计划的制订过程的情况、质量保证检查、质量保证活动的计划和对质量保证活动及方法的论证、质量保证检查的报告、数据和最终报告的审核、质量保证声明、质量保证与非监管研究和小型试验机构中的质量保证。即该标准适用于 GLP 原则下的质量保证活动。②良好实验室规范实施要求第 2 部分:良好实验室规范研究中项目负责人的任务和职责(GB/T 22275.2—2008)规定了项目负责人的任务、任命、培训、职责、资格、法律地位等等。③良好实验室规范实施要求第 3 部分:实验室供应商对良好实验室规范原则的符合情况(GB/T 22275.3—

2008)规定了 GLP 原则下的实验室供应商的要求,包括以下方面:标准和合格评定计划、实验系统、动物的饲料、垫料和水、带有放射性标记的化学品、计算机系统,应用软件、参照物质、仪器、无菌材料、常规试剂、清洁剂和消毒剂、微生物学检测需要的产品。④良好实验室规范实施要求第 4 部分:良好实验室规范原则在现场研究中的应用(GB/T 22275.4—2008)规定了现场研究的试验机构的组织和人员、质量保证计划、试验设施、仪器、原料、试剂、试验系统、试验样品和参照物、标准操作程序、研究结果的报告、记录和材料的存储和保留。⑤良好实验室规范实施要求第 5 部分:良好实验室规范原则在短期研究中的应用(GB/T 22275.5—2008)规定了短期研究的试验机构的组织和人员、质量保证计划、设施、实验系统、实验样品和参照物、细则操作程序、研究的实施和研究结果的报告。⑥良好实验室规范实施要求第 6 部分:良好实验室规范原则在计算机化的系统中的应用(GB/T 22275.6—2008)规定了 GLP 原则下计算机化的系统的应用与管理,包括各部门的责任、相关的培训、设备和仪器的要求、计算机化的系统的维护与灾难恢复、数据的记录与处理、计算机化的系统的安全、计算机化的系统的确认程序、关于其开发、确认、操作和维护的文档要求。⑦良好实验室规范实施要求第 7 部分:良好实验室规范原则在多场所研究的组织和管理中的应用(GB/T 22275.7—2008)规定了多场所研究的管理和控制、质量保证、主进度表、研究计划、研究的实施、研究结果的报告、标准操作程序、记录和材料的存储和保管。

(4) 四项良好实验室规范建议性文件,分别为:①良好实验室规范建议性文件—建立和管理符合良好实验室规范原则的档案(GB/T 22272—2008);②良好实验室规范建议性文件—良好实验室规范原则在体外研究中的应用(GB/T 22273—2008);③良好实验室规范建议性文件—在另一国家中要求和执行检查与研究审核(GB/T 22276—2008);④良好实验室规范建议性文件—在良好实验室规范原则的应用中委托方的任务和职责(GB/T 22277—2008)。

2. *制定了 GLP)标识使用及管理规定* 取得认监委良好实验室规范(GLP)符合性检查合格的机构,可在其报告、文件、办公用品、宣传品、网页上使用 GLP 标识声明其 GLP 符合性状态,表明该机构通过认监委良好实验室规范符合性检查(图 12-7)。



图 12-7 GLP 机构的中、英文标识

3. *GLP 实验室认可情况* 目前已有 7 家机构通过符合性检查,取得 GLP 实验室合格认可。

三、其他化学品

(一) 农药、兽药

我国是农药生产、使用和出口大国,促进我国农药 GLP 管理体系和农药 GLP 实验室的建设,是农药管理和形势发展的需要。我国农药 GLP 工作开展较晚,但近几年在 GPL 体系建

立，尤其是 GLP 国际互认方面开展了一些卓有成效的工作。

2003 年农业部颁布行业标准《农药毒理学安全性评价良好实验室规范》(NY/T 718—2003)，要求 2004 年 4 月开始实施。2005 年 2 月同意接纳中国作为 OECD/GLP 工作组的正式观察员，为我国争取农药登记 GLP 试验资料国际互认打下了良好的基础。2006 年 11 月农业部公告第 739 号《农药良好实验室考核管理办法》。2007 年颁布实施《农药理化分析良好实验室规范准则》(NY/T 1386—2007)。2008 年 6 月农业部发布《关于开展农药良好实验室规范符合性考核工作的通知》。2008 年 8 月农业部办公厅发布《关于印发〈农药良好实验室考核专家管理办法〉和〈农药良好实验室规范符合性考核评价表〉的通知》农办农[2008] 129 号。农药 GLP 准则要求，对农药 GLP 实验室申请单位就组织机构、人员、实验设施、仪器设备、运行与管理等进行符合性考查、评价和认可。农业部负责制定农药 GLP 考核技术规范和准则，负责农药 GLP 实验室考核和监督管理以及国际上农药 GLP 互认工作。具体工作由农业部农药检定所负责，如农药 GLP 实验室申请单位的资料审查与现场考核。农业部认可的农药 GLP 实验室，按照农药 GLP 准则完成的有关试验数据资料，可用于申请农药登记。

2010 年农业部首次公告了经考核合格的农药良好实验室(GLP)共 6 家机构，其中仅一家试验领域为农药残留、毒理学、环境毒理及环境行为试验，其余 5 家均为物理和化学试验。2013 年批准 29 个单位为农药登记毒理学试验单位，其中有 6 个单位注明符合农药良好实验室规范(GLP)要求。

(二) 新化学品

2003 年 10 月国家环境保护总局颁布《新化学物质环境管理办法》(环保总局令第 17 号)规定，新化学物质生产前和进口前必须实行申报登记并要求生产单位在申报时提供在中国境内用中国供试生物开展的生态毒性测试报告。先后制定与 GLP 有关的法律、法规和标准：2004 年《化学品测试合格实验室导则》HJ/T 155—2004)。2008 年《关于开展新化学物质登记测试机构检查的通知》(环办函〔2008〕22 号)。2009 年环保总局为规范新化学物质环境管理登记的科学性和测试机构的操作行为，提高新化学物质测试数据的准确性和可靠性，促进对国际上通用测试方法、测试数据和管理体系的互认和应用，参照国际通行的合格实验室准则(GLP)技术原则，结合我国化学品生态毒理学测试水平和实际情况，环保总局组织专家对申请为新化学物质登记提供生态毒理学数据的测试机构进行了现场检查和盲样测试考核，公布了 7 家通过检查的新化学物质登记测试机构名单，批准其所提供的生态毒理学数据可作为新化学物质登记评估的依据。2010 年立项修订 HJ/T 155 为“化学品测试合格实验室规范导则”，同时立项制订 3 项 GLP 环保标准——与 OECD 的 GLP 接轨，在操作层面具体细化；2012 年 5 月，国家环境保护部公开征求这 4 项标准的意见。2012 年，环保部发布《化学品测试合格实验室管理办法》。2012 年 12 月，环保部公告第一批 8 家化学品生态毒理 GLP 实验室(分级)。

《化学品测试合格实验室管理办法》适用于在中华人民共和国境内为化学品环境管理登记及相关化学品环境管理提供测试数据的合格实验室的测试和管理活动。化学品测试合格实验室(简称“合格实验室”)是指符合环境保护部颁布的化学品测试合格实验室规范(GLP)导则要求，且通过环境保护部检查、为化学品环境管理提供测试数据的测试机构。环境保护部负责组织制定合格实验室管理相关技术规范和准则，合格实验室检查专家库的组建、管理及培训，制定检查方案，以及对合格实验室的监督检查结果进行公告。具体工作委托环境保护部化学品登记中心。环境保护部负责组织合格实验室的检查和监督管理，开展化学品测试数据国际互认工作。2009 年，商务部牵头，启动申请加入 OECD 的 MAD 体系。

（三）食品

2008 年国家质量监督检验检疫总局和国家标准化管理委员会颁布了《实验室质量控制规范：动物检疫》（GB/T 27401—2008）、《实验室质量控制规范：植物检疫》（GB/T 27402—2008）、《实验室质量控制规范：食品分子生物学检测》（GB/T 27403—2008）、《实验室质量控制规范：食品理化检测》、GB/T 27404—2008）、《实验室质量控制规范：食品微生物检测》（GB/T 27405—2008）、《实验室质量控制规范：食品毒理学检测》（GB 27406—2008—T）6 个食品安全检测实验室质量控制规范的国家标准。该标准由国家认证认可标准化技术委员会（SAC/TC261）提出并归口，由中国合格评定国家认可中心负责起草。2008 年 10 月 1 日实施。在《实验室质量控制规范：食品毒理学检测》中规定了食品毒理学检测实验室质量控制的管理要求、技术要求、过程控制要求和结果质量控制要求。本标准包括食品毒理学检测实验室从受理申请、样品采集、样品处理及样品检验到出具检验报告、解释结果及提出建议全过程的质量控制要求。本标准适用于食品毒理学检测实验室，亦可供其他专业毒理学检测实验室参考使用。

该规范与其他 GLP 规范的不同之处，既参考了 ISO/IEC 17025《检测和校准实验室能力的通用要求》、ISO 15189《医学实验室——质量和能力的专用要求》、GB 15193.2《食品毒理学实验室操作规范》，也参考了 OECD GLP 规范，提出了针对食品毒理学检测实验室质量控制的要求。

（四）进出口化学品

2011 年国家质量监督检验检疫总局发布了我国出入境检验检疫行业标准《化学品毒理学安全性评价良好实验室规范》（SN/T 2881—2011），2011 年 11 开始实施。该标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。标准适用于为进出口化学品而进行的毒理学安全性评价试验。化学品毒理学安全性评价良好实验室必须遵守本标准。

四、发展展望

我国 GLP 的发展历程，自 20 世纪 90 年代初期到现在，已有二十几年的时间。但真正引起广泛重视、发展较快的是近十年，特别是欧盟颁布 REACH 法规后。从现状来看，GLP 法规体系已几乎覆盖化学品安全性评价领域。在 GLP 实验室建设和认可上，药物的 GLP 实验室发展已达到相当规模，在硬件上已达到国际水平，部分实验室在硬件和软件上已接近国际水平。其他化学品的 GLP 实验室除少数实验室外，多数无论在硬件和软件建设、规模、开展的评价项目、认可的数量等方面与国际水平还有相当距离。有些尚未见有认可的实验室，如食品毒理学检测、进出口化学品毒理学安全性评价。这说明 GLP 实验室建设在我国方兴未艾。而且，随着我国社会经济的发展，对化学品毒性鉴定或评价需求将不断地增加。展望未来，相信 GLP 实验室建设无论在数量上还是水平上将有更快、更大的发展。

为了使 GLP 实验室建设有更快、更大的发展，在毒理学实验室质量控制或管理上也有不少理论或实际问题有待研究解决。在认可的管理方面，原来主要有各行政管理机构负责管理的 GLP 体系和国家认监委组织负责管理的合格实验室认可体系，但现在国家认监委也将 GLP 实验室认可纳入其认可体系；而且认监委以国家标准的形式颁布了等同 OECD 的良好实验室规范，规范适用于法规所要求的所有非临床健康和环境安全研究，包括医药、农药、食品添加剂与饲料添加剂、化妆品、兽药和类似产品的注册或申请许可证，以及工业化学品管理。这无疑有利于与 OECD 等国际 GLP 水平接轨，有利于化学品及相关产品的国际贸易，也有利于

加入 OECD 的 MAD 体系。另一方面，认监委是以国家标准的形式颁布的，而其他行政管理机构是以法规颁布的，两者在适用范围上有重叠，与政府管理部门的职能分工也不一致。如何理顺管理体制和运行机制，以利于更好地管理、更有利于实验室的发展是值得重视和研究的问题。

在质量管理体系方面，食品毒理学检测实验室质量控制规范既参考了 ISO/IEC17025，也参考了 OECD GLP 规范，在将两种质量管理体系融合在一个标准上做了尝试，尽管目前尚无按此标准建设、运行良好的认可实验室；另外，有些 GLP 实验室又申请并得到了国家实验室认可或 ILAC 认可。这从实践上似说明将两种质量管理体系融合在一起有一定的合理性。因此，有必要研究将两种质量管理体系融合在一起的必要性、科学性和可行性。

由于中外文化、传统等方面的差异，使得在对待 GLP 的理念上、管理上存在差异甚至偏差，在一定程度影响了 GLP 实验室建设和管理水平。比如，国外实验室是我自己要做 GLP，而国内是政府要我做 GLP，因而非常重视管理机构的检查和要检查的内容，一些实验室为应对 GLP 检查提前半年以上就开始准备了。国外实验室重效果，而我们重形式。比如，OECD 和日本 GLP 的 SD 通常负责设计和批准研究计划，监督数据的收集、分析和签署报告；而我们规定机构负责人审查批准实验方案和总结报告，质量保证负责人审核实验方案和总结报告。实际上，OECD 在修改 GLP 时指出，经验显示，只有将正确开展研究的责任委派给一个专门人员负责，才能避免研究人员因接收到相互冲突的指示而导致研究计划的不良执行。在任何特定的时间对于一项研究只可能有一名项目负责人。又如，一个原本运行良好的实验室因为更换实验室主任，导致管理和运行出现较长时间混乱。这说明我们的某些制度只停留在形式上，未足够重视是否真正得到执行、效果如何。因此，有必要针对中外文化、传统等方面的差异，探索、研究如何使监管机构管理者和实验室各级人员正确地树立 GLP 意识、形成一些中国文化、传统而有效的管理制度或措施，以提高管理水平。

（张天宝）

第二篇　实验部分

实验一　实验动物生物材料的采集及解剖

一、目的和意义

在毒理学研究中，正确采集实验动物的血液、尿液或其他体液等生物材料进行常规检查或生化分析，是毒理学最基本和最重要的实验操作技术。对实验动物进行大体解剖检查，简便易行并能提供重要资料，是毒理学实验的常规观察项目。测定动物死后器官湿重和含水量是常用的指标之一，可以从大体标本大概地估计内脏器官病变的程度，特别适用于某些可致内脏水肿、实质细胞肿胀、间质纤维组织增生或脏器萎缩等外来化学物的研究。组织匀浆的制备以及在匀浆技术的基础上发展起来的亚细胞结构分离技术，也是毒理学实验的重要技术之一。

学习和掌握毒理学试验中常用动物的血、尿等生物材料的采集方法；实验动物的处死方法、大体解剖检查、脏器系数和含水量的测定以及组织匀浆的制备。

二、实习内容

(1) 小鼠、大鼠、豚鼠常用的采血方法。

(2) 大鼠代谢笼的使用和粪尿收集。

(3) 小鼠、大鼠与豚鼠常用的处死方法。

(4) 实验动物的大体解剖检查、脏器系数及含水量的测定。

(5) 肝组织匀浆的制备。

三、试剂和材料

1. 实验动物　成年小鼠、大鼠、豚鼠。

2. 器材

(1) 解剖器材：解剖剪刀、组织剪、眼科剪、手术刀、弯头小镊、血管钳、解剖板。

(2) 玻璃器材：离心管、玻璃毛细管、注射器、血色素吸管、烧杯、量筒、匀浆器、吸管、滴管。

(3) 仪器：大鼠代谢笼、离心机、搅拌器、天平。

3. 试剂　1%肝素生理盐水溶液、0.155 mol/L KCl 溶液、生理盐水。

4. 其他　酒精棉球、消毒纱布、滤纸、干棉球、消毒凡士林。

四、操作步骤

1. 血液的采集

(1) 大鼠与小鼠的采血方法

1) 鼠尾采血：当所需血量很少时采用本法。固定动物并露出鼠尾，将尾部浸入 45～50℃温水中数分钟，使尾静脉充血，擦干，再用酒精棉球擦拭消毒。剪掉尾尖(0.2～0.3 cm)，拭去第一滴血。然后用血色素吸管定量吸取尾血，或将尾血直接滴入容器内。采血完毕用干棉球压迫止血。亦可不剪尾，用 7～8 号注射针头连上注射器直接刺破尾静脉采血。

2) 眼眶静脉丛采血：当需用中等量的血液，而又避免动物死亡时采用本法。左手拇指及食指紧紧握住大鼠或小鼠颈部，压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血，但用力要恰当，防止动物窒息死亡。右手持玻璃毛细管从右眼或左眼内眦部以 45°角刺入，刺入深度小鼠为 2～3 mm，大鼠 4～5 mm。若遇阻力稍后退调整角度后再刺

入，如穿刺适当，血液能自然流入毛细管内。得到所需的血量后，即除去加于颈部的压力，拔出毛细管，用干棉球压迫止血。

3）断头采血：当需用较大量的血液，而又不需继续保存动物生命时采用本法。左手握住动物，右手持剪刀，快速剪掉头颈部，倒立动物让血液滴入容器。需注意防止断毛落入容器中。

（2）豚鼠心脏穿刺采血：将豚鼠仰卧位固定好，胸部常规消毒。在手触摸心跳最明显处穿刺，针头刺入心脏后即见血液涌入注射器。采血完毕迅速将针头拔出，这样心肌上的穿刺孔较易闭合，针眼处用酒精棉球压迫止血。

（3）采集血液的注意事项

1）实验动物一次采血量过多或采血过于频繁，都可影响动物健康，造成贫血甚至死亡，其最大安全采血量见表1。

表1 常用实验动物的安全采血量

动物品种	最大安全采血量(ml)	最小采血致死量(ml)
小鼠	0.1	0.3
大鼠	1	2
豚鼠	5	10
家兔	10	40
犬	50～100	200～500
猴	15	60

2）采血方法的选择，主要取决于实验的目的和所需血量的多少，所需血量较少时可刺破组织取毛细血管的血，当需血量较多时可作静脉采血，若需反复多次静脉采血时，应自远心端开始。

3）若需抗凝全血，在注射器或试管内需预先加入抗凝剂。

2. 尿液的收集

（1）大鼠和小鼠的留尿法：在小动物的毒理实验中，常常收集 24 h 或某特定时间内的尿液。为此常用代谢笼配上粪尿分离漏斗收集尿液，此装置除支架外均用玻璃或有机玻璃制成，便于清洗。该装置主要包括圆形有机玻璃笼罩，带孔的圆玻璃底盘，供饮水和食料的装置，锥形集尿漏斗和粪尿分离器等。动物置于代谢笼内，粪尿分离漏斗的侧口接一只150～200 ml 的集尿容器收集尿液。

一般 5～6 h 内，平均每只小鼠可收集到 0.4～0.5 ml 的尿液。如留尿前给予灌胃，每克体重灌液 0.02 ml，则可增至 0.7～0.8 ml。未经水负荷的正常大鼠，排尿量约为 0.5 ml/(100 g・体重・小时)。

猫和兔连续集尿装置的组成部分与大鼠的基本相同。但代谢笼常用铁丝和搪瓷制成。收集尿的容器要大一些。

（2）收集尿液的注意点

1）尿液收集器必须保证粪尿分开，防止粪便污染尿液。标本容器务须洁净，其容量视动物而定。

2）标本收集后，须在新鲜时进行检验，若需放置时间较久，则须贮放在冰箱或加入适当的防腐剂。

3）分析尿中金属离子时，代谢笼等应避免用金属材料制成，集尿容器最好用聚乙烯材料的。

4）为了满足实验所需尿量，在收集尿液前，可灌喂适量的水。

3. 实验动物的处死方法（大鼠和小鼠）

1）脊椎脱臼法：右手抓住鼠尾用力向后拉，同时左手拇指与食指用力向下按住鼠头。将脊髓与脑髓拉断，鼠便立刻死亡，这是小鼠最常用的处死方法。

2）断头法：用剪刀在鼠颈部将鼠头剪掉，迅速将鼠身倒置放血，由于剪断脑脊髓和大量失血，会很快死亡。但易引起肺淤血，因此，重点观察肺部病变的实验，不宜采用此法。

3）击打法：右手抓住鼠尾，提起，用力摔击其头部，鼠痉挛后立即死亡。或用小木锤用力击打鼠头部也可致死。

4）急性失血法：可采用鼠眼眶动脉和静脉急性大量失血方法使鼠立即死亡。左手拇指和食指尽量将鼠

头部皮肤捏紧，使鼠眼球突出。右手持弯头小镊，在鼠右侧眼球根部将眼球摘去，并将鼠倒置，头向下，此时血液很快从眼眶内流出。

5) 化学致死法：吸入 CO，大、小鼠在 CO 浓度为 0.2%～0.5%环境中即可致死。

另外，皮下注射士的宁(小鼠 0.76～2.0 mg/kg，大鼠 3.0～3.5 mg/kg)，吸入乙醚、氯仿均可致死。

4. 实验动物的剖检方法　动物尸体取仰卧位，将四肢固定，用水浸湿被毛。从下颌中央开始到耻骨联合正中垂直切口，用骨剪把左右肋骨剪断后，将胸骨向前下方翻开，即可暴露胸、腹腔。按胸腔、腹腔、颅腔的次序观察各脏器位置、形状及彼此相互关系，然后分别取下。先在胸腔入口处切断食道和气管，将心和肺一起取出。再依次摘除腹部脏器脾、肝、肾上腺、肾、胃、肠和盆腔器官，分别进行各脏器的检查。

在解剖和取材时，应尽量减少由于器械或手术粗暴引起的机械损伤。刀、剪要锋利，镊子应尽量镊在不重要的部位，以减少人为损伤。

5. 脏器系数和脏器含水量的测定　脏器系数指内脏器官重量(g)与体重(kg 或 100 g)的比值，含水量(g)指器官湿重与干重之差。其方法是动物在麻醉下用急性失血法处死，按上述剖检的顺序依次摘取所需脏器，用生理盐水稍加漂洗后吸干脏器表面水分，立即在感量为百分之一克天平上称重，称得的重量除以体重即得各脏器系数。测定含水量的部分，放在恒重的器皿中，准确称其湿重后，将组织尽量剪碎，在 105℃烘箱中烘烤 2 h 后，称其重量，再用同法烘烤，直至恒重，然后计算干、湿重差即得各脏器含水量。

6. 实验动物组织匀浆的制备　动物处死后，立即取出所需组织，置于干冰内备用。或置于冰块上，轻轻除去表面的凝血及结缔组织等附属物，再经冰冷生理盐水洗涤几次，用滤纸吸干水分，称取一定重量的组织备用。如有特殊需要或短期保存，应放入液氮中或冰箱冻结。

将已剥离处理好的脏器定量置于匀浆器中，按设计要求加入一定比例的溶液。以肝组织匀浆为例，称取 1 g 重的肝组织，在表面皿内剪碎后，以 1 : 9(1 份肝组织加 9 份0.155 mol/L KCl溶液)在匀浆器中稀释，用电动搅拌器以 3 000 r/min 的转速研磨2～3 min。再经 3 000 r/min 的转速，在 4℃中离心 10～15 min。取上清液即可测定肝组织匀浆的酶活力(GPT 或 GOT)。

实验二　急性毒性实验常用染毒方法及半数致死浓度的测定

一、目的

急性毒性研究的目的，主要是探求化学物的致死剂量，以初步评估其对人类的可能毒害的危险性。再者是求该化学物的剂量-反应关系，为其他毒性实验染毒剂量的选择提供依据。通过本实习要求掌握静式急性经呼吸道染毒的方法；掌握半数致死浓度(LC_{50})的测定方法和结果评定；了解经口、经皮以及动式呼吸道染毒的方法。

二、实验动物及器材

(1) 实验动物：健康成年大、小鼠。

(2) 材料：灌胃器材 1 套，静式吸入装置 1 套，剃毛刀，注射器，苦味酸酒精饱和液，二硫化碳，动物秤。

三、实验方法

1. 实验动物的选择和性别鉴定

(1) 外观：健康动物的外观为体形丰满，发育正常，被毛浓密有光泽且紧贴身体。眼睛明亮，行动迅速，反

应灵活，食欲良好。

（2）性别鉴定：小鼠的性别主要依据肛门与生殖器之间距离区分，间距大者为雄性，小者为雌性。

2. 实验动物的称重、编号和分组

（1）称重：大、小鼠称重的感应量需在 0.1 g 以下。

（2）编号：用 3%～5%苦味酸溶液，涂染实验动物不同部位的方法。

一般从头部开始编号，头部为 1 号，按顺时针方向向右前肢为 2 号，右肋为 3 号，右后肢为 4 号，尾部为 5 号，左后肢为 6 号，左肋为 7 号，左前肢为 8 号，背部为 9 号，不染色为 10 号。此法简单、易认，在每组实验动物不超过 10 只的情况下适用。

（3）实验动物分组应严格按照随机分组的原则进行，使每只动物都有同等机会被分配到各个实验组中去，尽量避免人为因素对实验造成的影响。

3. 小鼠灌胃染毒　采用 16 号灌胃针头，将灌胃针与注射器连接后，吸取一定量受试物溶液。右手抓住鼠尾稍向后拉，左手的拇指和食指、中指抓住颈部到背部的皮肤。将皮肤拉紧使头颈部不能活动（从颈部到胸部笔直地伸展躯体）。将灌胃针头的前端插入大鼠口腔，与体轴保持平行慢慢插入。针头的前端到达咽喉部时感到略有抵抗感，这时，将针头的前端稍偏向腹侧就可滑入食道。要注意大鼠是否出现呼吸困难或口腔呛出血的征兆，送进针头，无抵抗感可以顺利滑入。针头的前端到达胃部后（深度为 3～4 cm），将注射器内药物缓慢注入。一次注入胃内的容量以每 100 g 体重给药 1～2 ml 计。

4. 经皮肤染毒　正式给药前 24 h，将动物背部脊柱两侧毛发剪掉或剃掉，注意不要擦伤皮肤，因为损伤能改变皮肤的渗透性，受试物涂抹处不应少于动物体表面积的 10%。将受试物均匀地涂敷于动物背部，并用油纸和两层纱布覆盖，再用无刺激性胶布或绷带加以固定，以防脱落和动物舔食受试物，共敷药 24 h。试验结束后，可用温水或适当的溶剂清除残留的受试物。进行有关毒理学检查。

5. 动、静式经呼吸道染毒方法

（1）动式染毒法：动式染毒是采用机械通风装置，连续不断地将含有一定浓度受试样品的空气均匀不断地送入染毒柜，空气交换量大约为 12～15 次/h，并排出等量的染毒气体，维持相对稳定的染毒浓度（对通过染毒柜的流动气体应不间断地进行监测，并至少记录 2 次）。一次吸入性染毒 2 h。当受试化合物需要特殊要求时，应用其他的气流速率。染毒时，染毒柜内应确保至少有 19%的氧含量和均衡分配的染毒气体。一般情况下，为确保染毒柜内空气稳定，实验动物的体积不应超过染毒柜体积的 5%。且染毒柜内应维持微弱的负压，以防受试样品泄露污染周围环境。同时，应注意防止受试样品爆炸。

（2）静式染毒法：静式染毒是将实验动物放在一定体积的密闭容器（染毒柜）内，加入一定量的受试样品，并使其挥发，造成试验需要的受试样品浓度的空气，一次吸入性染毒 2 h。

染毒柜的容积以每只染毒小鼠每小时不少于 3 L 空气计，每只大鼠每小时不少于30 L计。

染毒浓度的计算：染毒浓度一般应采用实际测定浓度。在染毒期间一般可测 4～5 次，求其平均浓度。在无适当测试方法时。可用下式计算染毒浓度

$$C = (a \times d/v) \times 10^6$$

式中：C——染毒浓度（mg/m^3）；a——加入受试样品的量（ml）；d——化学品密度；v——染毒柜容积（L）。

按表 2 做记录。

表 2　急性毒性症状记录表

受试物名称				结构式		
实验时间				室温		
实验动物种系						
组别	剂量（mg/m^3）	动物编号	性别	体重（g）	症状出现时间	死亡时间

6. 小鼠二硫化碳 LD_{50} 测定

（1）预试验：可根据受试物的性质或已知资料，采用少量动物（2～3 只为一组），拉大组距，逐渐缩小，根

据 24 h 内死亡情况，估计 LD_{50} 的可能范围，确定正式试验的剂量组。如有相应的文献资料时可不进行预试。

(2) 实验动物：选择健康成年小鼠(18～22 g)，10 只，雌雄各半。同性别各剂量组个体间体重相差不得超过平均体重的 20%。试验前动物要在试验环境中至少适应 3～5 d 时间。

(3) 剂量设计：就二硫化碳而言，有关毒理学资料较全。吸入本品引起小鼠侧卧的浓度为 23.33 g/m^3 时，46 min；28.38 g/m^3 时，35 min；39.98 g/m^3 时，1 min。吸入 2 h，观察两周的最小致死浓度为 23.33 g/m^3，绝对致死浓度为 23.33 g/m^3。可见其毒作用带较窄，特别是吸入毒性更为明显。

通过二硫化碳的已知毒性资料，可以粗略找出其致死剂量范围在 23～38 g/m^3 之间。在引起动物 0%～100%死亡率的剂量范围内按等比级数(各剂量组之间各相差一个公比 γ)，设计若干个剂量组(一般常用 4～6 组)。最理想的结果是在 LC_{50} 的上下各有 2～3 组。

公比可用下式来求：

$$\gamma = \sqrt[n-1]{b/a}$$

式中，a 为 0%死亡率的剂量；b 为 100%死亡率的剂量；n 为动物组数。

(4) 观察指标：给药后一般观察 3 天，可参照附表中的内容进行观察并做记录，统计各组累积死亡率，作用长的受试物应延长观察时间。

(5) LD_{50} 的计算：计算 LD_{50} 的方法很多，有概率-对数绘图法、寇氏法、概率单位法、累积插值法、直线回归法、贯序法等等。本实验采用寇氏法计算二硫化碳的 LD_{50} 即 95%可信限。

寇氏法也称平均致死量法，是依据剂量对数与死亡率呈 S 型曲线所包括的面积推导出死亡率为 50%的剂量。

包括各组剂量(mg/kg)，剂量对数(X)、动物数(n)、动物死亡数(r)、动物死亡百分比(P，以小数表示)，以及统计公式中要求的其他计算数据项目。

• LD_{50} 的计算公式

根据试验条件及试验结果，可分别选用下列 3 个公式中的 1 个，求出 $\log LD_{50}$，再查其自然数，即 LD_{50}(mg/kg)。

1) 按本试验设计得出的任何结果，均可用式(1)：

$$\log LD_{50} = \sum \frac{1}{2}(X_i + X_{i+1})(P_{i+1} - P_i) \tag{1}$$

式中：X_i 与 X_{i+1} 及 P_{i+1} 与 P_i——分别为相邻两组的剂量对数以及动物死亡百分比。

2) 按本试验设计且各组间剂量对数等距时，可用式(2)：

$$\log LD_{50} = XK - \frac{d}{2}(P_i + P_{i+1}) \tag{2}$$

式中：XK——最高剂量对数，其他同式(1)。

3) 若试验条件同 2)且最高，最低剂量组动物死亡百分比分别为 100(全死)和 0(全不死时)，则可用便于计算的式(3)。

$$\log LD_{50} = XK - d(\sum P - 0.5) \tag{3}$$

式中：$\sum P$——各组动物死亡百分比之和，其他同式(2)。

• 标准误与 95%可信限

1) $\log LD_{50}$ 的标准误(S)：

$$S_{\log LD_{50}} = d\sqrt{\frac{\sum P_i(1-P_i)}{n}} \tag{4}$$

2) 95%可信限(X):

$$X = \log^{-1}(\log LD_{50} \pm 1.96 \cdot S_{\log LD_{50}} \quad (5)$$

此法易于了解,计算简便,可信限不大,结果可靠,特别是在试验前对受试物的急性毒性程度了解不多时,尤为适用。

7. 二硫化碳急性吸入实验毒性评价

根据实验动物急性中毒症状、死亡时间、LD_{50}值以及急性毒作用带,对二硫化碳的急性毒作用及毒效应特征作出初步评价。

四、注意事项

(1) 正确捉拿动物,防止被动物咬伤。

(2) 二硫化碳可经皮肤吸收,应防止沾染皮肤和溅入眼内。

(3) 剩余受试物应按规定回收。

(4) 静式染毒时,应防止受试物滴漏到染毒柜底部及周边,以免被动物舔舐,经口进入体内。设计的最高浓度不超过该毒物的蒸气饱和度。染毒结束后,应在通风柜内或通风处开启染毒柜,迅速取动物分笼喂养,继续观察(表3)。

表3 啮齿类动物中毒表现主要观察内容

系统器官	观察及检查项目	中毒后一般表现
中枢神经系统及神经肌肉系统	行为	改变姿态、叫声异常、不安、安静、震颤
	动作	运动失调、麻痹、惊厥、强制性动作
	对各种刺激的反应	易兴奋、被动、缺乏知觉、知觉过敏
	大脑及脊髓反射	减弱、缺乏
	肌肉紧张力	强直、弛缓
自主神经系统	瞳孔大小	扩大或缩小
	分泌	流泪、出汗
呼吸系统	鼻孔	流鼻涕
	呼吸性质和速率	弛缓、困难、潮式呼吸
泌尿系统	阴户、乳腺	肿胀
	阴茎	脱垂、遗精
	会阴部	污秽、有分泌物
皮毛	颜色、张力、完整性	皮肤充血、发绀,皮毛松弛、污秽
眼睛	眼睑	上睑下垂
	眼球	突出、充血、震颤
	透明度	混浊
其他	直肠或皮肤温度	降低、升高
	一般情况	姿态不正常、消瘦

实验三　鼠伤寒沙门菌回复突变实验

一、目的

鼠伤寒沙门菌回复突变实验是遗传毒理学体外试验，遗传学终点是基因突变，用于检测受试物能否引起鼠伤寒沙门菌基因组碱基置换或移码突变。

二、原理

鼠伤寒沙门菌的突变型(即组氨酸缺陷型)菌株在无组氨酸的培养基上不能生长，在有组氨酸的培养基上可以正常生长。致突变物可使沙门菌突变型回复突变为野生型(表现型)，因而在无组氨酸培养基上也能生长。故可根据在无组氨酸的培养基上菌落生成数量，检查受试物是否为致突变物。对于间接致突变物，可用经多氯联苯(PCBs)诱导的大鼠肝匀浆制备的S9混合液作为代谢活化系统。

三、仪器和试剂

1. 实验仪器　低温高速离心机，低温冰箱(−80℃)或液氮罐，洁净工作台，恒温培养箱，恒温水浴箱，蒸汽压力锅，匀浆器等实验室常用设备。培养基成分或试剂除说明外，应是化学纯，无诱变性。避免重复高温处理，选择适当保存温度和期限。

2. 培养基制备

(1) 营养肉汤培养基：牛肉膏2.5 g，胰胨(或混合蛋白胨)5.0 g，氯化钠2.5 g，磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)1.3 g，加蒸馏水至500 ml。加热溶解，调pH至7.4，分装后0.103 MPa 20 min灭菌，4℃保存备用。

(2) 营养肉汤琼脂培养基：用作基因型(*rfa*突变，R因子，pAQl质粒，*UvrB*)鉴定。琼脂粉1.5 g，营养肉汤培养基100 ml，加热融化后调pH为7.4，0.103 MPa 20 min灭菌。

(3) 底层培养基

1) 磷酸盐贮备液(V-B盐贮备液)：磷酸氢钠铵($NaNH_4HPO_4$)17.5 g，柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)10.0 g，磷酸氢二钾(K_2HPO_4)50.0 g，硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)1.0 g，加蒸馏水至100 ml，0.103 MPa 20 min灭菌，待其他试剂完全溶解后，再将硫酸镁缓慢放人其中继续溶解，否则易析出沉淀。

2) 40%葡萄糖溶液：葡萄糖40.0 g，加蒸馏水至100 ml，0.055 MPa 20 min灭菌。

3) 底层培养基(1.5%琼脂培养基)：琼脂粉6.0 g，蒸馏水400 ml，融化后0.103 MPa 20 min灭菌。趁热(80℃)，在灭菌琼脂培养基中(400 ml)依次无菌操作加入：磷酸盐贮备液8 ml，40%葡萄糖溶液20 ml，充分混匀，待凉至60℃左右时倒入平皿，每皿(内径90 mm)25 ml，37℃培养过夜以除去水分及检查有无污染。

(4) 顶层培养基

1) 顶层琼脂：琼脂粉3.0 g，氯化钠2.5 g，加蒸馏水至500 ml。

2) 0.5 mmol/L组氨酸-生物素溶液(诱变试验用)：D-生物素(相对分子质量244)30.5 mg，L-组氨酸(相对分子质量155)17.4 mg，加蒸馏水至250 ml。

3. 鉴定菌株基因型用试剂

(1) 0.1 mol/L组氨酸—0.02 mol/L D-生物素溶液(鉴定菌株用，无菌配制)：称取L-盐酸组氨酸(相对分子质量191.17)191.17 mg，D-生物素12.2 mg，溶于10 ml蒸馏水，0.103 MPa 20 min灭菌，保存于4℃冰箱。

(2) 0.8%氨苄西林溶液(鉴定菌株用，无菌配制)：称取氨苄西林40 mg，用0.02 ml/L氢氧化钠溶液5 ml溶解，保存于4℃冰箱。

(3) 0.8%四环素溶液(鉴定菌株用,无菌配制):称取 40 mg 四环素,用 0.02 mol/L 盐酸 5 ml 溶解,保存于 4℃冰箱。

(4) 0.1%甲紫溶液(鉴定菌株用):称取甲紫 10 mg,溶于 10 ml 蒸馏水。

4. 活化系统的制备

(1) 大鼠肝 S9 的诱导和制备:选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大白鼠,体重 150 g 左右,周龄 5~6 周。将多氯联苯(Aroclorl254)或国产 PCB-五氯溶于玉米油中,浓度为200 mg/kg,一次腹腔注射,5 d 后断头处死动物,取出肝脏称重后,用预冷的 0.15 mol/L KCl 溶液冲洗肝脏数次。每克肝(湿重)加预冷的 0.15 mol/L KCl 溶液 3 ml,连同烧杯移入冰浴中,用消毒剪刀剪碎肝脏,用匀浆器(低于 4 000 r/min,1~2 min)制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境。

将制成的肝匀浆在低温(0~4℃)高速离心机上,以 9 000 *g* 离心 10 min。吸出上清液为 S9 组分,分装。最好用液氮或-80℃低温保存。S9 应经无菌检查,蛋白质含量测定(Lowry 法),及间接致突变物鉴定其生物活性合格。

(2) S9 混合液的配制

1) 0.4 mol/L $MgCl_2$ - 1.65 mol/L KCl:称取 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 8.1 g, KCl 12.3 g 加蒸馏水稀释至 100 ml,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。

2) 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4),每 500 ml 由以下成分组成:磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 14.2 g/500 ml) 440 ml,磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 13.8 g/500 ml)60 ml,调 pH 至 7.4, 0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。

3) 10%S9 混合液的配制:每 10 ml 由以下成分组成,临用时配制。

灭菌蒸馏水	3.8 ml
磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH7.4)	5.0 ml
1.65 mol/L 氯化钾-0.4 mol/L 氯化镁溶液	0.2 ml
葡萄糖-6-磷酸溶液(0.05 mol/L)	40 μml
辅酶Ⅱ液(0.05 mol/L)	50 μmol
肝 S9 液	1.0 ml

混匀,置冰浴待用。

四、菌株及增菌培养

(1) 试验菌株采用四株鼠伤寒沙门突变型菌株 TA98、TA97、TA100 和 TA102。TA97、TA98 可检测移码型致突变物,TA100 可检测碱基置换型致突变物,TA102 可检出移码突变型和碱基置换型致突变物。

(2) 增菌培养取灭菌的25 ml 三角烧瓶,加入营养肉汤 10 ml,从试验菌株母板上刮取少量细菌,接种至肉汤中。37℃振荡培养 10 h。存活细菌密度可达(1~2)×10^9/ml。

五、菌株鉴定和保存

4 种标准试验菌株必须进行基因型鉴定、自发回变数鉴定及对鉴别性致突变物的反应鉴定,合格后才能用于致突变试验。

1. 菌株基因型鉴定

(1) 组氨酸营养缺陷鉴定(组氨酸需求试验):取 2 个底层培养基,其中一个培养基表面涂加 0.1 ml 的 0.1 mol/L 组氨酸-0.5 mmol/L 生物素溶液,另一个仅加 0.1 ml 的0.5 mmol/L生物素溶液。将试验菌株在此两组培养基上划线接种,经 37℃培养 24~48 h,观察生长情况。此 4 种菌株应在补充有组氨酸的培养基上生长,而在无组氨酸的培养基上不能生长。

(2) 深粗糙型(rfa)鉴定(甲紫抑菌试验):深粗糙型突变的细菌,缺失脂多糖屏障,因此分子量较大的物质能进入菌体。

鉴定方法:用移液器吸 0.1%甲紫溶液 20 μl,在肉汤平板表面涂成一条带,待甲紫溶液干后,在与甲紫带方向垂直划线接种 4 种试验菌株。经 37℃培养 24~48 h,观察生长情况。此 4 种菌株在甲紫溶液渗透区出现

抑菌,证明试验菌株有 rfa 突变。

(3) UvrB 缺失的鉴定(紫外线敏感试验):UvrB 缺失即切除修复系统缺失。鉴定方法:取受试菌液在营养肉汤琼脂平板上划线。用黑纸覆盖培养皿的一半,然后在 15 W 的紫外线灭菌灯下,距离 33 cm 照射 8 s,37℃培养 24 h。对紫外线敏感的 3 个菌株(TA97、TA98、TA100)仅在没有照射过的一半生长,而菌株 TA102 在没有照射过的一半和照射过的一半均能生长。

(4) R 因子和 pAQl 质粒的鉴定:带有 R 因子的菌株具有抗氨苄西林的特性,TA102 菌株含 pAQl 质粒具有抗四环素的特性。

用甲紫抑菌实验的方法,在两个肉汤平板上分别滴加氨苄西林溶液 20 μl(浓度为1 mg/ml,溶于 0.02 mol/L NaOH)和四环素溶液 20 μl(浓度为 0.08 mg/ml,溶于0.02 mol/L HCl),并在肉汤平板表面涂成一条带,待溶液干后,垂直划线接种 4 种试验菌株。经 37℃培养 24～48 h,观察生长情况。4 个菌株生长应不受氨苄西林抑制,证明它们都带有 R 因子。TA102 菌株生长应不受四环素抑制,证明带有 pAQl 质粒。

2. 自发回变数测定　取已融化并在 45℃水浴中保温的顶层培养基一管(2 ml),加入测试菌菌液 0.05～0.2 ml,迅速混匀,倒在底层培养基上,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化。37℃培养 48 h 观察结果。计数回变菌落数。每株的自发回变率应落在表 4 所列正常范围内。

3. 对鉴别性致突变物的反应　对鉴别性致突变物的反应试验菌株对不同致突变物的反应不同,应该在有和没有代谢活化的条件下鉴定各试验菌株对致突变物的反应。可按下述的点实验或平皿掺入实验的方法进行。各试验菌株对鉴别性致突变物的反应见表 5。

4. 菌株保存

鉴定合格的菌种应加入 DMSO 作为冷冻保护剂,保存在－80℃或液氮(－196℃),或者冰冻干燥制成干粉,4℃保存。

六、实验设计

受试物最低剂量为每平皿 0.1 μg,最高剂量为 5 mg,或出现沉淀的剂量,或对细菌产生最小毒性剂量。一般选用 4～5 个剂量,进行剂量-反应关系研究,每个剂量应做 2 或 3 个平行平皿。溶剂可选用水、二甲基亚砜(每皿不超过 0.4 ml)或其他溶剂。每次实验应有同时进行的阳性对照和阴性(溶剂)对照。

七、方法和步骤

实验方法有平板掺入法和点试法。一般先用点试法作预试验,以了解受试物对沙门菌的毒性和可能的致突变性,平板掺入法是标准实验方法。

(1) 平板掺入法在底层培养平皿上写上记号。取已融化并在 45℃水浴中保温的顶层培养基一管(2 ml),依次加入受试物溶液 0.1 ml,测试菌液 0.05～0.2 ml(需活化时加 10%S9 混合液 0.5 ml),迅速混匀,倒在底层培养基上,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化,37℃培养 48 h 观察结果。

(2) 点试法:在底层培养平皿上写上记号。取已融化并在 45℃水浴中保温的顶层培养基两管(2 ml),加入测试菌液 0.05～0.2 ml(需活化时加 10%S9 混合液 0.5 ml),迅速混匀,倒在底层培养基上,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化。取无菌滤纸圆片(直径 6 mm),小心放在已固化的顶层培养基的适当位置上,用移液器取适量受试物(如10 μl),点在纸片上,或将少量固体受试物结晶加到纸上或琼脂表面,37℃培养 48 h 观察结果。

八、结果与评价

(1) 点试法凡在点样纸片周围长出一圈密集的 his^+ 回变菌落者,该受试物即为致突变物质。如只在平板上出现少数散在的自发回变菌落,则为阴性。如在滤纸片周围见到抑菌圈,说明受试物具有细菌毒性。

(2) 掺入法计数培养基上的回变菌落数。如在背景生长良好条件下,受试物每皿回变菌落数增加一倍以上(即回变菌落数等于或大于 2 乘以空白对照数),并有剂量-反应关系或至少某一测试点有重复的并有统计学意义的阳性反应,即可认为该受试物为诱变阳性。当受试物浓度达到 5 mg/皿仍为阴性者,可认为是阴性。

(3) 报告的试验结果应是两次以上独立实验重复的结果。如果受试物对4种菌株、(加和不加S9)平皿掺入试验均得到阴性结果,可认为此受试物对鼠伤寒沙门菌无致突变性。如受试物对一种或多种菌株(加或不加S9)平皿掺入试验得到阳性结果,即认为此受试物是鼠伤寒沙门菌的致突变物。

九、安全措施与废弃物处理

(1) 应有专门的实验室,应有良好的通风设备。

(2) 试验者必须注意个人防护,尽量减少接触污染的机会。

(3) 受试的致癌物与致突变物的废弃处理,原则上按放射性核素废弃物处理方法进行。

(4) 所用沙门菌试验菌株一般毒性较低,具有R因子的危害更小。但要防止沙门菌污染动物饲养室。

表4 菌株生物学特性鉴定标准、标准诊断性诱变剂、试验记录及报告格式

菌株	基因型					自发回变(−S9)
	组氨酸缺陷	脂多糖屏障缺失	抗氨苄西林	抗四环素	UvrB修复缺陷	
TA97	+	+	+	−	+	10～180
TA98	+	+	+	−	+	30～50
TA100	+	+	+	−	+	120～200
TA102	+	+	+	−	+	240～320

表5 鉴别性致突变物在点试中试验结果

致突变物	剂量	S9	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛菌素	5.0 μg	−	−	+	−	++
叠氮钠	1.0 μg	−	+	−	++++	−
ICR-191	1.0 μg	−	+	+	++	+++
丝裂霉素C	2.5 μg	−	++++			++
2,4,7三硝基芴酮	0.1 μg	−		++++	++	+
4-硝基-O—苯撑二胺	20.0 μg	−	++	+++	+	+++
4-硝基哇琳-N-氧化物	10.0 μg	−	+	++	++	+++++
甲基磺酸甲酯	2.0 μg	−	+	−	+	+++
敌克松	50.0 μg	−	++++	+++	++++	+
2-氨基芴	20.0 μg	−	+++	++++	+++	
甲基硝基亚硝基胍	2.0 μg	−	+	−	+++	+++

实验四 动物骨髓细胞染色体畸变分析

一、目的

学习动物骨髓细胞染色体标本制作,了解动物体内染毒及染色体畸变类型。

二、原理

染色体畸变的产生与微核的形成原理相同，观察终点不同，染色体畸变只能在细胞分裂的中期相进行观察和分析。为收集足够的中期相细胞，在收获细胞前，用秋水仙碱或乙酰甲基秋水仙碱处理，以阻断微管蛋白的聚合，抑制细胞分裂时纺锤体的形成，使分裂间期和前期的细胞停留在中期相。细胞通过低渗，使染色体均匀散开，然后固定、染色，可在油镜下观察。

三、器材与试剂

(1) 器材：小剪刀、镊子、10 ml 离心管、滴管、载玻片、离心机、水浴箱、生物显微镜(×100 物镜)、注射器(5 ml)。

(2) 试剂：500 mg/L 秋水仙素，0.75 mol/L KCl 液；固定液甲醇 3 份冰乙酸 1 份混匀，临用时配；姬姆萨(Giemsa)储备液取 Giemsa 染料 1 g，逐渐加入少许甘油在研钵中研细溶解，共加入甘油 60 ml 混匀。于 60℃水浴中保温 2 h，冷却后再加 66 ml 甲醇混匀，于室温中静置 1～2 周，过滤置棕色瓶保存备用；pH6.8 磷酸盐缓冲液：取甲液 49.5 ml，乙液 50.5 ml 混匀即可。甲液 1/15 mol/L Na_2HPO_4：称取 Na_2HPO_4 9.48 g 溶于 1 000 ml 蒸馏水中。乙液 1/15 mol/L。KH_2PO_4：称取 KH_2PO_4 9.07 g 溶于 1 000 ml 蒸馏水中。若 Na_2HPO_4 或 KH_2PO_4 含有结晶水，应重新计算称取量；环磷酰胺或丝裂霉素 C；PBS Na_2HP0_4 1.15 g、NaH_2PO_4 0.2 g、KCl 0.2 g、NaCl 8.0 g 溶于 1 000 ml 蒸馏水中。

四、实验设计

(1) 动物一般选用成年大、小鼠，每组 6～10 只，最好雌雄各半。

(2) 染毒与取样时间：一般染毒一次或多次，多次更为合理。研究证明即使损伤的细胞不会积累，化学物质也需在靶器官蓄积至一定的浓度才有诱变作用。一般在末次染毒后24 h处死动物，收获细胞。

(3) 剂量选择最高剂量应达最大耐受剂量或毒物的 30%～80% LD_{50} 剂量。低毒物质应以最大给药量或大于人使用剂量的 50～100 倍。一般设 3～5 个剂量组，剂量跨度在10^2～10^3或更大。阴性对照组给予溶剂；阳性对照组给予 30～50 mg/kg 环磷酰胺，经腹腔注射 1 或 2 次。

(4) 给药途径尽量采用受试物进入机体途径，或根据毒物的性质、研究目的而定，一般采用经口、皮、呼吸道或腹腔等。

五、操作步骤

(1) 收获细胞：处死动物前 2～4 h，腹腔注射秋水仙素，小鼠剂量为 4 mg/kg，大鼠剂量为 1 mg/kg。小鼠用颈椎脱臼法处死动物，大鼠用动静脉放血法处死动物，迅速取出双侧股骨，去肌肉，擦净血污，剪开两端关节面，用注射器吸 PBS 液 5 ml 冲出骨髓于离心管中，用1 500 r/min离心 10 min，去上清液。

(2) 低渗：打散沉淀物，加入预温 37℃的 0.075 mol/L KCl 约 6 ml，混匀，于 37℃低渗15～20 min，再加固定液 1～2 ml 混匀，立即于 1 000 r/min 离心 10 min，弃上清液。

(3) 固定：使细胞重新悬浮，加入固定液 4 ml 混匀，放置室温 10～20 min，然后 1 000 r/min 离心 10 min，去上清液。同样方法再固定一次，去上清液，留约 0.5 ml。

(4) 制片：染色使细胞悬浮，将细胞悬液滴于冰冻的载玻片上，干燥，用 10% Giemsa 染色液染色 10～20 min，取出清洗自然干。

(5) 阅片：在低倍镜下选择分散良好，细胞未破裂的中期分裂相，观察并记录染色体结构异常和数目异常细胞。

六、结果分析与评价

以每只动物为观察单位，每只动物观察 100 个中期分裂相，计算其畸变细胞率，阴性和阳性对照组的畸变率应与所用动物的种属及有关资料相符。实验结果的数据可用泊松分布、二项分布、Dunnet、t 检验、χ^2 检验等多种统计方法分析，所得结果是相同的。各实验组畸变细胞率与阴性对照组相比较，差别有显著性意义，并有剂量

反应关系，或某一剂量组呈现可重复的并有统计学意义的增加，则此受试物的小鼠骨髓染色体畸变实验阳性。

七、注意事项

低渗是本实验的关键，控制好低渗时间，做出分散良好的染色体标本，关系到实验结果的准确性。

实验五　小鼠骨髓多染性红细胞微核实验

一、目的

(1) 了解微核实验在毒理学评价中的作用。

(2) 了解微核实验的染色方法。

(3) 基本掌握小鼠骨髓多染性红细胞微核实验的实验设计，操作步骤及结果评价。

二、原理

微核实验是用于染色体损伤和干扰细胞有丝分裂的外源化学物的快速检测方法。微核是在细胞的有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍然留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝粒断片或环。它在末期以后，单独形成一个或几个规则的次核，被包含在子细胞的胞质内而形成，由于比核小得多故称微核。这种情况的出现往往是由于受到染色体断裂剂作用的结果。另外，也可能在受到纺锤体毒物的作用时，主核没有能够形成，代之以一组小核。此时小核往往比一般典型的微核稍大。骨髓中嗜多染红细胞数量充足，微核容易辨认，而且微核自发率低，是微核实验的首选细胞群。

三、试剂与材料

1. 试剂

(1) 市售小牛血清：56℃恒温水浴灭活 1 h。在无菌条件下分装于小的无菌冻存管中，每管 1 ml 即可。冷冻保存。

(2) pH7.4 磷酸盐缓冲液配制：

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.814 g
磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	19.077 g
加蒸馏水至	1 000 ml

(3) Giemsa 染液：称取 Giemsa 染料 3.8 g，加入少量甲醇于乳钵里仔细研磨，再加入甲醇至 375 ml 和甘油，混合均匀，放置 37℃恒温箱中保温 48 h。保温期间，振摇数次，促使染料的充分溶解，取出过滤，两周后用。

(4) Giemsa 应用液：取 1 份 Giemsa 原液与 9 份 pH7.4 磷酸盐缓冲液混合而成。

2. 材料　生物显微镜、解剖剪、镊子、止血钳、注射器、灌胃针头、载玻片、盖玻片(24 mm×50 mm)、染色缸、塑料吸瓶、纱布、滤纸等。

四、实验步骤

1. 实验动物　小白鼠是微核实验的常规动物，也可选用大白鼠。通常用 7～12 周龄，体重 25～30 g 的小鼠或体重 150～200 g 的大鼠。每组用两种性别的动物至少各 5 只。

2. 剂量分组　一般取受试物的LD_{50}的1/5,1/10,1/20和1/100等4～5个剂量组,另设空白对照(即溶剂对照组)和环磷酰胺阳性对照组(环磷酰胺腹腔注射20～30 mg/kg,或经口灌胃40 mg/kg)。

3. 给药方式　实验前弄清受试物的理化性质,以确定受试物所用的溶剂。染毒途径根据实验目的而定,通常采用经口灌胃或腹腔注射方式。采用30 h两次给药方法,即两次给受试物间隔24 h,第2次给受试物后6 h取材制片。

4. 试验方法

(1) 骨髓的制取:小鼠颈椎脱臼处死后,打开胸腔,暴露胸骨,沿着胸骨柄与肋骨交界处剪断,剥掉附着其上的肌肉,擦净血污,横向剪开胸骨,暴露骨髓腔,然后用止血钳挤出骨髓液。

(2) 涂片:将骨髓液滴在载玻片一端的小牛血清液滴里,仔细混匀。一般来讲,两节胸骨髓液涂一张片子为宜。然后,按血常规涂片法涂片,长度为2～3 cm。在空气中晾干,或微热吹干(注意不能烤干或吹风太近)。在玻片毛片部分用铅笔编号。

(3) 固定:将干燥的涂片放入甲醇液中固定5～10 min,取出在通风处晾干。即使当日不染色,也应固定后保存。

(4) 染色:将固定过的涂片放入Giemsa应用液中,染色10～15 min,然后立即用pH6.8磷酸盐缓冲液或蒸馏水冲洗,晾干。

5. 镜检与计数　先用低倍镜,后用高倍镜粗略检查,选择细胞分布均匀,细胞无损,着色适当的区域,再在油浸镜下计数。

本法观察含微核的嗜多染红细胞。嗜多染红细胞呈灰蓝色,成熟红细胞呈淡橘红色。微核大多数呈单个圆形,边缘光滑整齐,嗜色性与核质相一致,呈紫红色或蓝紫色,直径通常为红细胞的1/20～1/5。

每只动物计数1 000个嗜多染红细胞,并记录含有微核的细胞数,及其定位指标。微核率以千分率表示。为观察骨髓细胞分裂是否受抑制,求出每只动物骨髓细胞中多染性红细胞/成熟红细胞(PCE/NCE)之比。正常情况下PCE/NCE为1.53～1.68。

6. 数据处理　所得数据可采用卡方检验,u检验或其他合适的统计方法进行组间差异的显著性检验。

五、结果评定

正常小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率一般在0～0.4%,动物个体微核率的正常值上限则为0.3%。

试验组与对照组相比,实验结果微核率有明显的剂量-反应关系并有统计学意义时,即可确认为阳性结果。若统计学上有显著性差别,但无剂量-反应关系时,则须进行重复实验。结果能重复者可判为该化学物小鼠骨髓多染性红细胞微核实验为阳性结果。

实验六　小鼠精子畸形实验

一、目的

学习和掌握小鼠精子畸形实验的原理和步骤。

二、原理

精子畸形是指精子的形状异常及畸形精子数量的增加。

引起精子畸形的机制尚未最后阐明，正常情况下，精子的成熟与正常形态发生过程受多种基因调控，一旦这些基因中的一个或多个在化学毒物的作用下发生突变，就会导致畸形精子数量的大量增加。因此，当环境化学物使上述基因发生突变时，就会导致精子畸形或畸形率增高。

精子发育过程是从精原干细胞→初级精母细胞→次级精母细胞→精细胞→精子。各种诱变剂作用于精子的不同发育阶段，可在接触该种诱变剂后不同时间出现精子畸形。一般认为，精原细胞后期或初级精母细胞早期的生殖细胞对化学诱变剂较为敏感，故一般在接触诱变剂后第 4～5 周最易出现精子畸形或畸形率增高。

三、意义

小鼠精子畸形实验为评价外源化学物对生殖细胞遗传损伤提供了一个简易、方便的方法。多种化学致突变物能引起精子形态异常，因此精子畸形实验也是对一组评价遗传损伤试验方法的补充。

生殖系统对化学毒物作用十分敏感，在其他系统还未出现毒性反映之前，生殖系统就可能已出现了损害作用。正常情况下，哺乳动物本身也存在少量精子，但在某些化学毒物的作用下，特别是可引起生殖细胞遗传性损伤的化学毒物作用下，哺乳动物产生的畸形精子会大量增加。因此，可以用检查雄性动物接触化学毒物后精子畸形率的高低，来反应该化学毒物的生殖毒性和对生殖细胞的潜在的致突变性。

虽然精子形态检查的终点并不能用来直接衡量遗传学损伤，但是对评价化学物的危险度（risk）是有价值的，理由是：①一个化学物能诱导精子形态变化就是有力的证据，表明它能干扰精子正常生成与成熟；②有些能引起遗传性精子损伤的化学物亦能引起精子头部畸形；③化学物引起小鼠精子头部损伤与它引起生殖细胞突变的能力高度相关。这些情况表明小鼠精子形态试验结果阳性的化学物应该被认为是哺乳类动物生殖细胞的潜在诱变剂。

四、试剂器材

1. 药物及试剂

(1) 环磷酰胺：以灭菌生理盐水配成 20 mg/ml。

(2) 甲醇：化学纯，固定用。

(3) 2.5%伊红染色液。

(4) 磷酸盐缓冲液或生理盐水。

2. 器材

(1) 解剖板 1 块。

(2) 眼科剪 1 把。

(3) 眼科镊子 1 把。

(4) 玻璃平皿 1 个。

(5) 玻璃离心管 1 支。

(6) 擦镜纸 4 张。

(7) 小漏斗 1 只。

(8) 带乳头滴管 1 支。

(9) 载玻片 2 张。

(10) 试管架 1 只。

(11) 显微镜。

五、实验方法

1. 剂量与分组　设阴、阳性对照组，至少 3 个剂量组，接触外来化合物后每组至少存活 5 只动物。最高剂量组 5 天总剂量应使动物部分死亡。一般取受试物的最大耐受量或急性 LD_{50} 的 2～4 倍作为最高剂量，此剂量一下再设 2～3 个以 1/2 LD_{50} 或更低的等比级数降低的剂量。在受试物的毒性作用较低而不至于引起动物死亡时，可采用人体接触剂量的 100 倍为最高剂量，然后以此最高剂量的 1/4 或更小作为下一剂量组的接触剂量，依此类推。对于不稳定或稳定性不详的受试物，应每天新鲜配制。阳性对照组腹腔注射环磷酰胺，剂量为 20 mg/kg 体重。阴性对照为溶剂对照。

2. 给药方法　选择体重 25～30 g 性成熟的雄小鼠，按各种受试物实际侵入途径，选择适当的给药途径，可 1 次或连续 5 次给药。有报告认为，连续 5 次给药更具有重现性。也给药物 1、4、10 周每组处死动物 5 只，进行制片。也可在给药后每一周处死一批动物，连续动态观察，直到精子形态恢复正常。

3. 制片方法

(1) 于染毒后 5 周脱颈椎处死小鼠，剪开腹腔，取出一侧附睾，放入盛有 3 ml 生理盐水的小平皿内。

(2) 用眼科剪把附睾剪碎，吸管吹打 5～6 次，静置 3～5 min。

(3) 用 4 层擦镜纸，放在玻璃小漏斗上进行过滤，滤液放入离心管内。

(4) 加入 2 滴伊红水溶液，用吸管轻轻吹打均匀，吸 1～2 滴于载玻片上，用滴管手推制片。

(5) 空气干燥后，用甲醇固定 5 min，空气干燥后(水洗)镜检。每只小鼠计数完整的精子 200～500 个，每一剂量组计数 1 000～2 000 个(至少 1 000 个)精子中的畸变精子数。

六、观察指标及评价

精子畸形主要表现在头部，可分为无钩、香蕉形、无定形、胖头、尾折叠、双头及双尾等。判断双头双尾的畸形时，要注意与 2 条精子的部分重叠相鉴别。无头、尾精子、头部重叠或整个精子重叠的均不计数。除记录下畸形精子数外，还要分别记录下各种类型畸形的精子数，进行畸形类型的构成比分析。

评价精子畸变阳性的标准是：出现可重复的剂量-反应关系时，可判断实验结果为阳性。即要判定某一化学毒物为精子畸形诱变剂，至少应该有两个相邻剂量组的精子畸变率与阴性对照比较用非参数秩和检验方法统计处理有显著差异($P<0.01$)；或达到阴性对照组的 2 倍或 2 倍以上，并且实验结果能够重复，则也可认为实验结果阳性。如果试验组的染毒剂量已使动物动物发生死亡，而精子畸形仍未见增加，则可判定实验结果为阴性。

精子畸形实验可以作为毒性实验的量性生殖毒性的终点，但它的用途通常仅限于那些具有明显生殖细胞毒性的化学物，因此，当化学物具有很轻微的作用时，其终点观察的意义是有限的。

正常值：正常小鼠的精子畸变率为 1.3%。

七、实验报告

实验报告包括试验题目、目的、意义、原理、试验操作、结果、评价、讨论分析等。

实验七　大鼠致畸实验

一、目的

检测妊娠动物接触某些化学物质后引起胎鼠畸形的可能性，掌握致畸实验中胎仔畸形和有关指标的检测方法。

二、原理

母体在妊娠期受到可通过胎盘屏障的某种有害物质作用，影响胚胎的器官分化与发育，导致结构和机能的缺陷，出现胎仔畸形。因此，在受孕动物的胚胎着床后，并已开始进入细胞及器官分化期时投予受试物，可检出该物质对胎仔的致畸作用。

三、仪器与试剂

1. 仪器与器材　实验室常用设备、生物显微镜及体视显微镜、游标卡尺(百分尺)。

2. 试剂　实验用水为蒸馏水。

(1) 甲醛、冰乙酸、2,4,6-三硝基酚、氢氧化钾、甘油、水合氯醛、茜素红。

(2) 茜素红溶液:茜素红 0.1 g,氢氧化钾 10 g,蒸馏水 1 000 ml。(剥皮用染色液。)

(3) 茜素红贮备液:茜素红饱和液,50%乙酸饱和液 5.0 ml,甘油 10.0 ml,1%水合氯醛 60.0 ml 混合,放入棕色瓶中。

(4) 茜素红应用液:取贮备液 3~5 ml,用 1~2 g/100 ml 氢氧化钾液稀释至 1 000 ml,存于棕色瓶中。

(5) 透明液 A:甘油 200 ml、氢氧化钾 10 g,蒸馏水 790 ml 混合。

(6) 透明液 B:甘油与蒸馏水等量混合。

(7) 固定液(Bouins 液):2,4,6-三硝基酚(苦味酸饱和液)75 份、甲醛 20 份、冰乙酸 5 份。

四、实验步骤

1. 实验动物　常用实验动物为大鼠。选用健康性成熟(90~100 d)大鼠,雌性未交配过的大鼠 80~90 只,雄性减半。

2. 剂量和分组　至少设 3 个剂量组,最高剂量应能引起母鼠某些毒性反应,如体重减轻等,但不应引起 10%以上动物的死亡。低剂量组不应引起可观察到的毒性反应。另设阴性对照组,对某种新的动物,初次实验可设一阳性对照组,阳性对照物可选用敌枯双、维生素 A 等。每组至少 12 只孕鼠。

3. 试验方法

(1) "孕鼠"的检出和给受试物时间:雌鼠和雄鼠按 1∶1(或 2∶1)同笼,每日晨观察阴栓(或阴道涂片),查出阴栓(或精子)的当天定为孕期零天。如果 5 d 内没查出"受精鼠"应调换雌鼠。检出的"受精鼠"按随机分组。在孕期 6~15 d,每天经口给予受试物。孕鼠于妊娠期 0、6、10、15 和 20 d 称重,并根据体重调整受试物剂量。

(2) 孕鼠处死和一般检查:大鼠于妊娠第 20 d 处死。剖腹检查卵巢内黄体数,取出子宫,称重;检查活胎、早期吸收和死胎数。

(3) 活胎鼠检查:逐一记录胎鼠体重、体长、尾长、检查胎鼠外观有无异常,如头部有无脑膨出、露脑、小头、小耳、小眼、无眼和睁眼、兔唇、下颌裂,躯干部有无腹壁裂、脐疝、脊柱弯曲,四肢有无小肢、短肢、并趾、多趾、无趾等畸形,尾部有无短尾、卷尾、无尾、肛门有无闭锁。

(4) 胎鼠骨标本的制作与检查:将每窝 2/3 的活胎鼠放入 95%(V/V)乙醇中固定 2~3 周,取出胎仔(或可去皮、去内脏及脂肪)流水冲洗数分钟后放入 1~2 g/100 ml 的氢氧化钾溶液内(至少 5 倍于胎仔体积)8~72 h,透明后放入茜素红应用液中染色 6~48 h,并轻摇1~2 次/d,至头骨染红为宜。再放入透明液 A 中 1~2 d,放入透明液 B 中 2~3 d,待骨骼染红而软组织基本褪色,将标本放入小平皿中,用透射光源,在体视显微镜下作整体观察,然后逐步检查骨骼。测量囟门大小、矢状缝的宽度、头顶间骨及后头骨缺损情况,然后检查胸骨的数目、缺失或融合(胸骨为 6 个,骨化不全时首先缺第 5 胸骨、次为缺第 2 胸骨)。肋骨通常 12~13 对,常见畸形有融合肋、分叉肋、波状肋、短肋、多肋、缺肋、肋骨中断。脊柱发育和椎体数目(颈椎 7 个,胸椎 12~13 个,腰椎 5~6 个,底椎 4 个,尾椎 3~5 个),有无融合、纵裂等。最后检查四肢骨。

(5) 胎鼠内脏检查:每窝的 1/3 胎鼠放入 Bouins 液中,固定两周后作内脏检查。先用自来水冲去固定液,将鼠仰放在石蜡板上,剪去四肢和尾,用刀片从头部到尾部逐段横切或纵切。按不同部位的断面观察器官的大小、形状和相对位置。正常切面见图 1。

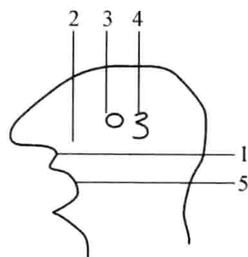


图 1　正常切面示意

1) 经口从舌与两口角向枕部横切(切面 1),观察大脑、间脑、延髓、舌及腭裂。

2) 在眼前面作垂直纵切(切面 2),可见鼻部。

3) 从头部垂直通过眼球中央作纵切(切面 3)。

4) 沿头部最大横位处穿过作横切(切面 4)。

以上切面的目的可观察舌裂、腭裂、眼球畸形、脑和脑室异常。

5) 沿下腭水平通过颈部中部作横切(切面 5),可观察气管、食管和延脑或脊髓。

以后自腹中线剪开胸、腹腔，依次检查心、肺、横膈膜、肝、胃、肠等脏器的大小、位置，查毕将其摘除，再检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫或睾丸位置及发育情况。然后将肾脏切开，观察有无肾盂积水与扩大。

致畸实验记录内容见表6。

表6 致畸实验记录内容

动物交配后给受试物日期	解剖检查日期	胎仔检查
动物编号	母体解剖所见	体表检查
动物种、品系	卵巢重量	骨骼检查
交配时周龄	黄体数	内脏检查
确认受孕	着床数	
临床症状	胎盘重量	
进食进水量	胎仔子宫内位置	
受试物及溶剂	死胎数	
剂量	活胎数	
给样途径	胎仔重	
给样期限		

4. *统计方法* 各种率的检查用 χ^2 检验，孕鼠增重用方差分析或非参数统计，胎鼠身长、体重、窝平均活胎数用 T 检验。结果应能得出受试物是否有母体毒性和胚胎毒性、致畸性，最好能得出最小致畸剂量。

五、结果评定

为比较不同有害物质的致畸强度，可计算致畸指数，以致畸指数10以下为不致畸，10～100为致畸，100以上为强致畸。为表示有害物对人体危害的大小，可计算致畸危害指数，如指数大于300说明受试物对人危害小，100～300为中等，小于100为危害大。

$$致畸指数 = \frac{雌鼠\ LD_{50}}{最小致畸剂量} \qquad 致畸危害指数 = \frac{最大不致畸剂量}{最大可能摄入量}$$

解释致畸试验结果时，必须注意种属差异。试验结果从动物外推到人的有效性很有限。

主要参考文献

1 Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 7th ed. New York, McGraw-Hill, 2008
2 Lu FC, Kracew S. Lu's Basic Toxicology. Fundamental, Target and Risk Assessment. 5th ed. New York, Informa Healthcare USA, 2009
3 Hayes AW. Principles and Methods of Toxicology. 4th ed. New York, Raven Press, 2001
4 Niesink RJM, de Vries J and Hollinger MA. Toxicology. Principles and Applications. CRC Press, Boca Raton, 1996
5 Derekanko MJ and Hollinger MA. Handbook of Toxicology. 2nd. New York, CRC Press, 2001
6 Timbrell J. The Poison Paradox: Chemistry as Friend and Foes. Oxford, University Press, 2005
7 Riviere JE. Biological Concepts and Techniques in Toxicology. New York, Taylor & Francis, 2006
8 Jasra OP. Encyclopedia of Toxicology. New Delhi, Ivy Publishing House, 2003
9 LaDou J. Current Occupational & Environmental Medicine. 3rd ed. New York, Mcgraw-Hill, 2004
10 Hamadeh HK. Toxicogenomics: Principles and Applications. New York, John Wiley & Sons, 2004
11 Bass P. Pathology: A Core Text of Basic Pathological Processes with Self-assessment, 2nd ed. Singapore, Elsevier, 2003
12 Lewis AR. Lewis' Dictionary of Toxicology. 2nd ed. Academic Press, 1998
13 Hodgson E. Dictionary of Toxicology. 2nd ed. London, Macmillan Reference Ltd, 1998
14 周志俊. 基础毒理学. 上海:复旦大学出版社,2008
15 王心如. 毒理学基础. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社,2012
16 周宗灿,付立杰. 现代毒理学简明教程. 北京:军事医学科学出版社,2012

[General Information]
书名=基础毒理学 第2版
作者=周志俊主编；张天宝，唐萌副主编；金泰廙主审；周志俊，王素华，洪峰，常秀丽，朱勇飞，韩光亮，杨惠芳，唐萌，吴庆，牛侨，范奇元，张天宝编委
页数=299
SS号=13619090
DX号=
出版日期=2014.08
出版社=复旦大学出版社

封面
书名
版权
前言
目录
第一篇　理论部分
　第一章　毒理学概述
　　第一节　毒理学基本概念
　　第二节　毒理学研究范畴
　　第三节　毒理学研究方法
　　第四节　毒理学历史与发展
　　第五节　毒理学在预防医学中的应用
　第二章　毒物在体内的过程
　　第一节　毒物的吸收、分布和排泄
　　第二节　毒物的生物转化
　　第三节　毒物动力学
　第三章　毒作用及其影响因素
　　第一节　毒效应谱和毒作用类型
　　第二节　毒作用机制
　　第三节　毒性作用影响因素
　第四章　常规毒性测试及其替代实验
　　第一节　常规毒性及描述参数
　　第二节　经典实验方法
　　第三节　替代实验
　第五章　外源化学物的致癌作用
　　第一节　化学致癌物的分类
　　第二节　化学致癌机制
　　第三节　化学致癌的影响因素
　　第四节　外源化学物致癌性的测试和评价
　　第五节　外源化学物致癌的预防
　第六章　遗传毒性
　　第一节　概述
　　第二节　遗传毒性的形成机制及影响
　　第三节　遗传毒性的检测方法
　第七章　生殖毒性与发育毒性
　　第一节　概述
　　第二节　生殖毒性与发育毒性机制
　　第三节　生殖毒性与发育毒性评价
　第八章　靶器官毒理学
　　第一节　肝脏毒理学
　　第二节　肾脏毒理学

第三节　免疫毒理学
第四节　神经和行为毒理学
第五节　其他系统毒理学
第九章　毒理学安全性评价、健康危险度评定和危险管理
第一节　化学物的毒理学安全性评价
第二节　健康危险度评定
第三节　健康危险度评估的发展方向
第四节　危险管理和交流
第十章　毒理学应用及分支
第一节　卫生毒理学
第二节　药物毒理学
第三节　生态毒理学
第四节　其他分支
第五节　纳米毒理学
第十一章　毒理学实验基础
第一节　实验设计原则
第二节　毒理学实验结果的统计分析
第三节　整体动物实验
第四节　离体器官实验
第五节　细胞实验
第六节　分子生物学实验
第七节　毒理基因组学
第十二章　毒理学实验室质量管理
第一节　毒理学实验室质量管理体系的产生背景和意义
第二节　良好实验室规范
第三节　GLP质量管理体系在我国的应用现状和展望
第二篇　实验部分
实验一　实验动物生物材料的采集及解剖
实验二　急性毒性实验常用染毒方法及半数致死浓度的测定
实验三　鼠伤寒沙门菌回复突变实验
实验四　动物骨髓细胞染色体畸变分析
实验五　小鼠骨髓多染性红细胞微核实验
实验六　小鼠精子畸形实验
实验七　大鼠致畸实验
主要参考文献